

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

## RECHERCHES SUR LA TENEUR DES VINS EN RUBIDIUM. (1)

par GABRIEL BERTRAND et DIDIER BERTRAND.

Il est largement démontré aujourd'hui que le rubidium existe à côté du potassium et du sodium dans l'organisme des plantes et dans celui des animaux. Il est donc logique de penser que le vin, si abondamment consommé dans certains pays et en particulier dans le nôtre, doit être une source importante d'introduction du rubidium dans le corps humain. C'est afin d'éclairer l'aspect quantitatif de cette question que nous avons entrepris les recherches exposées dans le présent mémoire.

Avec le bienveillant concours de MM. Albert Demolon, Inspecteur général de l'Agriculture ; Genevois, Professeur à l'Université de Bordeaux ; Boischot, Directeur de la Station centrale d'Agronomie de Versailles ; Brémond, Professeur de l'Institut agricole d'Algérie ; Bordas, Directeur de la Station de Recherches agronomiques d'Avignon ; Ferré, Directeur de la Station œnologique de Bône, Engel, chargé du cours d'œnologie à la Faculté des Sciences de Dijon, que nous sommes heureux de remercier ici, ainsi que les viticulteurs qui ont bien voulu s'intéresser à nos recherches en nous adressant des matériaux d'études nécessaires, nous avons réuni une série d'échantillons de vins purs et d'origines certaines, que nous avons analysés. Après quelques essais préliminaires, la technique suivante a été adoptée : 40 cm<sup>3</sup> de vin ont été évaporés à sec au bain-marie dans une capsule de platine, puis la capsule a été

(1) Un extrait de ce travail a été publié dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1949, 228, 1461.

portée dans un four à moufle chauffé électriquement à une température proche du rouge naissant. Les cendres ont été traitées ensuite, comme nous l'avons fait jusqu'ici lorsqu'il s'agissait de cendres végétales, de manière à isoler l'ensemble des métaux alcalins à l'état de chlorures et, finalement, nous avons passé 10 mg. de ce mélange desséché au spectrographe de Féry. La lecture du spectrogramme a été faite à l'électrophotomètre enregistreur de Sannié.

Nous avons obtenu les résultats suivants, rapportés au litre de

TABLEAU I.

NOM DES VINS	CENDRES (g.)	K (g.)	Na (g.)	Rb (mg.)
<i>Vins de Bordeaux :</i>				
(Rg) Pauillac (Médoc), 1947 . . . . .	2,59	1,21	0,011	1,28
(Rg) Château Canon (Saint-Emilion), 1947. .	2,09	0,89	0,014	0,97
(Rg) Cru des Conseillans (Haux) [Gironde], 1944 . . . . .	1,7	0,80	0,090	0,84
<i>Vins de Bourgogne :</i>				
(Bl) Clos de Vougeot, 1944 . . . . .	1,8	1,12	0,006	0,35
(Bl) Clos de Vougeot, 1946 . . . . .	2,54	0,76	0,008	0,22
(Rg) Volnay (Beaune), 1947 (terrain calcaire).	1,89	0,90	0,004	0,87
(Rg) Beaujolais, 1947 (terrain granitique) . .	2,52	1,26	0,005	1,35
<i>Vins du Rhône :</i>				
(Rg) Chiroubles, 1933. . . . .	1,71	0,79	0,009	1,29
(Rg) Châteauneuf-du-Pape (côtes), 1947 (ter- rain à cailloux roulés) . . . . .	2,04	0,87	0,065	0,89
(Bl) Châteauneuf-du-Pape (côtes), 1947 (même terrain . . . . .	1,66	0,66	0,010	0,55
(Rg) Aramon de plaine (environs d'Avignon).	2,23	1,13	0,011	1,16
<i>Vins de Champagne :</i>				
(Bl) Champagne brut, 1948 . . . . .	2,01	7,15	0,470	0,38
(Bl) Champagne champagnisé, 1948. . . . .	1,62	6,25	0,490	0,28
<i>Vins d'Anjou :</i>				
(Bl) Cru de la Grée, 1947 . . . . .	1,24	0,47	0,011	1,00
(Bl) Cru les Fougerays, 1947 . . . . .	1,48	0,52	0,010	0,70
(Bl) Cru la Rousselle, 1947 . . . . .	1,07	0,39	0,014	0,29
(Bl) Cru Sicot, 1947. . . . .	1,46	0,69	0,011	0,38
<i>Vins du Midi :</i>				
(Bl) Gaillac (Tarn), 1947 . . . . .	2,69	1,13	0,025	1,94
(Ros) Tavel-Château-Manissy, 1947 . . . . .	2,02	0,97	0,02	1,97
<i>Vins d'Algérie :</i>				
(Rg) Commune de Margueritte (département d'Alger), 1946 (éboulis argilo-calcaire). . .	1,79	0,80	0,022	1,00
(Ros) Commune d'Ain-el-Hadjar (Mascara) [département d'Oran], 1946 (sol silico-cal- caire) . . . . .	1,88	0,90	0,012	0,54
(Rg) Commune de Lodi (Médéa) [département d'Alger] (coteaux argileux) . . . . .		1,08	0,015	1,81



vin. Les vins sont présentés à peu près par région et, suivant qu'ils sont blancs, rouges ou rosés, leur nom est précédé de l'indice (Bl), (Rg) ou (Ros).

Si l'on range les vins selon leur teneur croissante en rubidium et, d'autre part, en les divisant en trois groupes d'après leur couleur, comme on le fait ici : tableau II, on met en évidence une

TABLEAU II.

VINS BLANCS	Rb (mg.)	VINS ROUGES	Rb (mg.)
Clos de Vougeot . . . . .	0,22	Clos des Conseillans . . . . .	0,84
Champagne (champagnisé), 1948. . . . .	0,28	Volnay, 1947. . . . .	0,87
Cru la Rousselle, 1947 . . . . .	0,29	Châteauneuf-du-Pape rouge . . . . .	0,89
Clos de Vougeot, 1944 . . . . .	0,35	Saint-Émilion . . . . .	0,97
Cru Sicot . . . . .	0,38	Alger . . . . .	1,00
Champagne brut, 1948 . . . . .	0,38	Pauillac . . . . .	1,28
Châteauneuf-du-Pape blanc. . . . .	0,35	Chiroubles . . . . .	1,29
Clos les Fougerays, 1947. . . . .	0,70	Beaujolais . . . . .	1,35
Clos de la Créé. . . . .	0,97	Alger. . . . .	1,81
Gaillac. . . . .	1,94	Aramon . . . . .	4,16
VINS ROSÉS		Rb (mg.)	
Oran !. . . . .		0,54	
Tavel . . . . .		1,97	

relation qui, sans être absolue, est cependant très manifeste entre la couleur des vins et leur teneur en rubidium. Et l'on peut dire, en résumant les résultats obtenus, que :

Les *Vins blancs* contiennent en général moins de 1 mg. de rubidium par litre : trouvé de 0,22 à 1 mg. dans neuf vins sur dix, soit en moyenne 0 mg. 46 et, en tenant compte de la teneur exceptionnelle du vin de Gaillac, 0 mg. 61 ;

Les *Vins rouges* renferment ordinairement deux à trois fois plus de rubidium que les vins blancs : trouvé comme moyenne de dix vins sur onze, 1 mg. 15 et, en tenant compte de la teneur exceptionnelle du vin d'Aramon, 1 mg. 41 ;

Les *Vins rosés* semblent se rapprocher des vins rouges par leur teneur en rubidium. Il n'en a été analysé que deux échantillons ; l'un renfermait 0 mg. 54 et l'autre 1 mg. 97 du métal alcalin.

## RECHERCHES SUR LES CAUSES DE VARIATION DE LA TENEUR DES VINS EN RUBIDIUM (1)

par GABRIEL BERTRAND et DIDIER BERTRAND.

Comme on l'a vu dans le précédent mémoire (2), nous avons trouvé, en étudiant 22 échantillons de vins purs et d'origines certaines, de 0 mg. 22 à 4 mg. 16 de rubidium par litre. De plus, il est apparu, en rangeant ces vins d'après leur teneur croissante en métal alcalin, que les vins rouges renferment ordinairement deux à trois fois plus de rubidium que les vins blancs.

A quelles causes peuvent tenir ces différences ?

Si le vin était un produit direct et exclusif du raisin, il n'y aurait à chercher ces causes que dans la variation de la composition chimique du raisin suivant la variété à laquelle il appartient, la nature du sol qui le nourrit, les influences climatiques qu'il a dû subir. Mais le vin est en même temps un produit de transformation provoquée par l'homme et cela, d'après des méthodes qui changent non seulement d'une région à une autre, mais dans une région, suivant la volonté d'obtenir, parfois même avec des grains à peau colorée, soit un vin blanc, soit un vin plus ou moins coloré en rouge (3).

Pour avoir une première idée de l'importance de la variation de composition des raisins, nous avons analysé des grains entiers

(1) Un résumé de ce mémoire a été publié dans : *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 1622.

(2) Ces *Annales*, 1949, **77**, 541.

(3) On sait que la matière colorante du raisin étant localisée dans la peau, on n'obtient un vin coloré que si on met à fermenter ensemble le jus et la peau : la matière colorante se dissout alors au fur et à mesure de la production de l'alcool, le vin est d'un beau rouge quand la peau est très colorée et reste assez longtemps dans le liquide en fermentation ; il est rosé lorsqu'on enlève la peau après un temps court de fermentation ou que le raisin est naturellement de faible coloration. En ne soumettant à la fermentation que du jus séparé de la peau aussitôt après son extraction des grains, on peut obtenir du vin blanc aussi bien à partir d'un raisin noir que d'un raisin blanc.

Il ne saurait être question ici des vins blancs réalisés par décoloration de vins rouges avec du charbon activé ou même de l'acide sulfureux. De tels vins ne ressortissent pas de l'œnologie classique, mais de l'industrie chimique du raisin.



provenant de quatre échantillons d'origine française, de belle qualité, vendus à Paris. Ces grains ont été isolés à peu près sans perte de suc cellulaire en les faisant tourner autour de leur axe avec le pouce et l'index d'une main et tirant doucement, tandis que le pédoncule est maintenu très près du grain entre les deux mêmes doigts de l'autre main. Nous avons analysé aussi un raisin de dessert préparé par dessiccation, sans pépin, à peau fine, connu sous le nom de raisin d'Alexandrie, qui nous a été rapporté d'Egypte. Nous avons trouvé :

DÉSIGNATION DES RAISINS	MATIÈRE SÈCHE (p. 100)	CENDRES Matière sèche (p. 100)	PAR KILOGRAMME de matière sèche		
			K (g.)	Na (g.)	Rb (mg.)
Blanc dit de Thomery (grains presque sphériques, blonds, semi-translucides, à un pépin par grain) . . . . .	16,0	1,86	7,2	0,009	2,00
Blanc dit de la Montagne (gros grains presque sphériques, de couleur verte glauque. Il y a deux et quelquefois trois pépins par grain.) . . . . .	18,8	2,52	8,3	0,04	2,78
Blanc dit de Moissac (grains presque sphériques, blonds dorés, presque translucides, contenant un ou deux pépins par grain) . . . . .	20,8	2,97	8,9	0,07	4,36
Noir dit Olivette (grains allongés en forme d'olives, de coloration foncée, contenant un à quatre pépins par grain) . . . . .	17,9	2,60	13,4	0,04	9,05
Blanc dit d'Alexandrie . . . . .	86,4	1,77	8,2	0,08	5,38

On ne peut tirer de règle générale et définitive d'un nombre aussi restreint d'analyses, mais on peut déjà remarquer que la teneur en rubidium des grains de raisin a varié de 2 à 9 mg./kg. de matière sèche, ce qui suffit pour retenir la différence de composition des raisins parmi les causes de variation de la teneur des vins en rubidium. On remarquera en outre que l'échantillon de raisin rouge est de beaucoup le plus riche, renfermant près du double de la quantité de rubidium contenue dans l'échantillon de raisin blanc le plus avantagé à ce point de vue. Cette dernière remarque est aussi en accord avec l'observation d'une teneur en rubidium généralement plus élevée des vins rouges que des vins blancs.

Pour savoir si la méthode de vinification intervenait à son tour dans la teneur en rubidium du produit obtenu, nous avons effectué l'expérience suivante :

Un lot de grains de raisin (dit de la Montagne), détachés à la main des pédoncules ramifiés ou rafles (ou aussi râpes, suivant les

régions) qui les portent dans la grappe, a été soumis à l'action d'une forte presse à vis ; on a séparé ainsi 1.276 g. de moût sucré et il est resté 180 g. de marc formé par les peaux et les pépins.

Aussitôt extrait (1<sup>er</sup> novembre 1947), le moût a été additionné de 1 centimètre cube d'une culture de levure (de Saint-Emilion) et, après répartition homogène, on l'a divisé en deux parties égales dans des matras A et B. On a laissé tel quel le moût en A et l'on a ajouté à celui contenu en B la moitié des rafles et la moitié du marc ; puis, le col des matras étant simplement fermé par un capuchon de papier à filtre, on a abandonné à la fermentation dans une pièce du laboratoire maintenu à + 19 — 20°.

En A, la fermentation est apparue avec lenteur et s'est prolongée longtemps. En B, au contraire, elle s'est manifestée avec vigueur et s'est terminée rapidement (4).

Ainsi, en A, après vingt-quatre heures, le moût, au fond duquel s'était réuni un dépôt floconneux assez abondant, était encore trouble et l'on y apercevait seulement de très fines bulles dont l'ascension, lente et continue, commençait à former à la surface quelques taches roussâtres, de faible épaisseur, dues à la réunion de cellules de levure, de particules organiques entraînées et de bulles de gaz carbonique plus ou moins persistantes.

En B, après le même temps, il y avait aussi un dépôt floconneux, le liquide était également trouble, mais on y voyait des bulles beaucoup plus grosses et rapides qu'en A et une partie importante du mélange de rafles et de peaux avait déjà été amenée à la surface, accompagnée de levure et de mousse carbonique.

Après deux jours, l'aspect de A ressemblait beaucoup à celui de la veille : les très fines bulles s'y élevaient seulement plus nombreuses et les taches superficielles s'étaient étendues à toute la surface du liquide. En B, l'effervescence était très active et la presque totalité des pédoncules et des peaux formait un chapeau à moitié soulevé hors du liquide par la mousse carbonique.

Après environ une semaine, exactement le neuvième jour, le dégagement gazeux paraissait terminé en B, on a agité le contenu des matras et on l'a transvasé dans des flacons (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>) de 250 cm<sup>3</sup>, munis de capuchons à vis et préalablement stérilisés. Dans cette opération, on a eu soin de passer le contenu de B à travers un entonnoir de porcelaine à plaque perforée, pour

(4) Chaptal mentionne dans son ouvrage classique sur « L'Art de faire, gouverner et perfectionner les vins » (Paris, 801) que Don Gentil avait observé dans ses expériences « que la fermentation marche avec plus de force et de régularité dans un moût mêlé avec la grappe, que dans celui qui en a été dépouillé » (p. 48 et 78) et il a reproduit cette mention dans sa « Chimie appliquée à l'Agriculture » (Paris, 1829, p. 147). Malgré ce que l'on a découvert depuis cette époque, il serait intéressant d'étudier de plus près ce phénomène.



séparer le mélange de rafles, de peaux et de pépins. On a pris en outre la précaution de ne pas remplir complètement les flacons, mais d'y laisser un espace vide de 5 à 6 cm<sup>3</sup>, pour éviter une fuite du contenu en cas de fermentation postérieure, accompagnée de mousse.

Il s'est déposé, de part et d'autre, un précipité grisâtre ou lie relativement dense, surnagé en A<sub>1</sub> par un liquide faiblement coloré en jaune paille, un peu trouble, et en B<sub>1</sub> par un liquide plus coloré, jaune orangé, plus trouble que le précédent. La fermentation s'est poursuivie doucement, de plus en plus lente, dans les premiers flacons, durant un peu plus de deux semaines, tandis qu'elle était visiblement achevée dans les seconds. Le vin s'est lentement dépouillé des substances qu'il tenait en suspension, mais pas d'une manière aussi complète dans celui obtenu par la fermentation en présence de rafles, de peaux et de pépins que dans le vin préparé avec le moût seul. Tandis que ce dernier avait acquis une limpidité parfaite après deux à trois mois, l'autre possède encore aujourd'hui (sept. 1949) une légère opalescence.

Nous avons procédé à l'analyse comparative de ces deux vins âgés de dix-huit mois. Les chiffres ci-dessous rapportés au litre, ont été trouvés :

NATURE DES VINS	CENDRES (g.)	K (g.)	Na (g.)	Rb (mg.)
Obtenu avec le moût seul . . .	1,45	0,49	0,006	0,36
Obtenu en présence des peaux, des rafles et des pépins . . .	1,91	0,98	0,007	0,60

Pour bien comprendre ce qui s'est passé dans l'expérience décrite ci-dessus, il faut observer qu'au cours de la fermentation alcoolique d'un raisin il n'y a pas simplement dissolution de la matière colorante contenue dans la peau par l'action de l'alcool formé, il y a aussi plasmolyse plus ou moins avancée des tissus qu'on laisse, volontairement ou involontairement, dans le jus sucré. Les pépins, protégés par un tégument épais et fortement lignifié, résistent beaucoup à cette plasmolyse, mais il n'en est pas de même des rafles et des peaux, qui ne tardent pas à échanger leurs produits solubles avec le liquide dans lequel elles sont plongées. Si donc on trouve moins de rubidium dans le vin préparé avec le jus seul du raisin que dans celui qui est obtenu en présence des rafles et des peaux, c'est qu'il doit y avoir davantage du métal alcalin dans ces dernières parties de la grappe que dans le moût.

Nous avons vérifié qu'il en est bien ainsi par l'analyse com-

parée de la chair, de la peau, des pépins et des pédoncles de trois des raisins qui figurent dans le tableau rapporté au début de ce travail.

Pour réaliser cette analyse, des grains ont été séparés des pédoncles comme il a été déjà indiqué ; on en a prélevé un lot de 25 à 30 g. que l'on a analysés directement, puis un autre, d'environ 200 g. Ces derniers grains ont été fendus avec un scalpel et on en a extrait les pépins avec une petite pince à mors plats, sans s'inquiéter, cette fois, du liquide sucré qui s'écoule. Les pépins ont été frottés dans un linge pour les débarrasser d'un peu de pulpe adhérente et soumis à l'analyse. Quant aux grains épépinés, on les a malaxés et pressés avec les mains, dans une serviette repliée en forme de nouet, de manière à en expulser le mieux possible la partie pulpeuse. La masse résiduelle, retirée de la serviette, a été divisée, regonflée par addition d'eau distillée et pressée de nouveau, et cela à deux reprises. Ce sont les peaux, ainsi débarrassées de la chair, que l'on a analysées. C'est en retranchant du poids des substances dosées dans les grains entiers ceux qui provenaient des peaux et des pépins que l'on a calculé la composition de la chair.

Voici les chiffres que nous avons trouvés :

NATURE DES RAISINS	MATIÈRE SÈCHE (p. 100)	CENDRES Matière sèche (p. 100)	PAR KILOGRAMME de matière sèche		
			K (g.)	Na (g.)	Rb (mg.)
Raisin dit de la Montagne :					
Grains entiers . . . . .	18,75	2,52	8,3	0,038	2,78
Grains épépinés . . . . .	18,1	2,08	9,75	0,044	2,69
Chair . . . . .	17,6	2,21	7,5	0,035	2,2
Peaux . . . . .	24,2	4,44	21,5	0,114	11,9
Pépins . . . . .	70,8	4,81	4,95	0,026	1,24
Rafles . . . . .	25,0	7,66	28,0	0,41	7,25
Raisin dit de Moissac :					
Grains entiers . . . . .	20,8	2,97	8,9	0,068	4,36
Chair . . . . .	19,8	2,91	9,0	0,065	4,2
Peaux . . . . .	25,2	3,86	12,2	0,0805	6,8
Pépins . . . . .	69,4	2,88	3,04	0,089	3,61
Rafles . . . . .	51,6	10,1	31,7	0,196	6,18
Raisin dit Olivette . . . . .					
Grains entiers . . . . .	17,95	2,60	13,4	0,11	9,05
Chair . . . . .		2,02	11,4	0,11	9,05
Peaux . . . . .		7,0	35,9	0,158	13,5
Pépins . . . . .	68,4	2,64	3,77	0,032	2,78
Rafles . . . . .	29,9	13,17	52	0,269	16,3

En définitive, la variation de la teneur des vins en rubidium tient



à deux causes principales : la première est liée, comme on devait s'y attendre, à la composition chimique des raisins ; la seconde dépend de la méthode de vinification. Les peaux et les péduncules du raisin étant plus riches en matières sèches et en rubidium que la chair, le vin préparé avec du moût seul contient une proportion moindre du métal alcalin que celui obtenu avec la totalité du grain ou de la grappe.

**DETERMINATION**  
**DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES (VI-PHAGE TYPING)**  
**ET CARACTÈRES BIOCHIMIQUES DE SOUCHES**  
**DE *SALMONELLA TYPHI***  
**ISOLÉES DANS LES HOPITAUX MILITAIRES**  
**DE LA MÉTROPOLE ET DE CERTAINS TERRITOIRES**  
**DE L'UNION FRANÇAISE**

par A. JUDE et P. NICOLLE (\*).

(Laboratoire Central de Bactériologie de l'Armée  
et Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

La méthode de Craigie, 1938, par l'utilisation de bactériophages spécifiques des formes de *Salmonella typhi* possédant l'antigène Vi, permet de classer les souches de ce bacille en un certain nombre de types et de sous-types (24), qu'aucune méthode sérologique n'est parvenue, jusqu'à présent, à distinguer.

A de rares exceptions près, les types sont stables, c'est-à-dire qu'à travers les vicissitudes des contaminations d'homme à homme, des passages sur les animaux d'expérience ou des repiquages en milieux de culture (Yen, 1940), à la seule condition que l'antigène Vi ne disparaisse pas, chaque souche se maintient dans son type originel. Cette stabilité des types bactériophagiques du bacille typhique donne à la méthode un intérêt pratique considérable : tous les bacilles isolés d'un même malade ou d'un même porteur de germes, tous les bacilles isolés chez différents malades contaminés par le premier appartiendront au même type.

La méthode de caractérisation des types du bacille typhique est donc particulièrement précieuse pour l'épidémiologiste, puisqu'elle permet à celui-ci de déceler dans une région d'endémicité les rapports qui unissent divers cas sporadiques, de dépister l'existence de plusieurs foyers, de reconstituer la filiation des cas, de prouver la responsabilité d'un porteur de germes dans l'apparition d'un groupement épidémique, bref, de conduire ses

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juin 1949.



enquêtes beaucoup plus loin qu'il ne pouvait le faire avant l'invention de la méthode. Il peut ainsi entreprendre en toute connaissance de cause la lutte contre ce fléau.

Presque en même temps Kristensen, 1938, a proposé une classification de *S. typhi* d'après les caractères fermentatifs sur le xylose et l'arabinose. Les types fermentatifs de Kristensen, beaucoup moins nombreux que les types bactériophagiques, puisqu'on n'en compte que trois, seraient aussi épidémiologiquement stables, bien que quelques auteurs (Attimonelli, 1947; Reul, 1949) affirment avoir obtenu en culture la transformation d'un type en un autre type.

Il nous a paru intéressant de combiner, comme l'ont proposé Olitzki et collab., 1948, ces deux méthodes de classement; chaque type bactériophagique pourrait ainsi être subdivisé en trois sous-types. On obtiendrait ainsi une différenciation plus étendue. Certains types bactériophagiques étant particulièrement fréquents, cette caractérisation complémentaire donnerait plus de précision aux enquêtes épidémiologiques.

Notre étude a porté sur 280 souches de bacilles typhiques, isolées au cours des années 1946, 1947 et 1948, chez 276 sujets en traitement dans les formations militaires, en France et dans les autres territoires de l'Union française.

Leur origine est la suivante :

France. . . . .	42
Algérie. . . . .	62
Maroc. . . . .	134
Tunisie . . . . .	16
Indochine . . . . .	17
A. O. F. (Dakar). . . . .	6
Nouméa. . . . .	3

273 souches ont été isolées par hémoculture; 4 ont été obtenues par coproculture; une a été isolée des urines; une autre, du liquide céphalo-rachidien; enfin, la dernière provenait du pus d'une ostéite où le bacille typhique était associé à un staphylocoque. Elles avaient été envoyées au Laboratoire Central de Bactériologie de l'Armée pour étude bactériologique et sérologique, aussi ne possédons-nous que peu de renseignements cliniques sur la gravité de l'affection qu'elles avaient déterminée. Quelques-unes d'entre elles ont été cependant à l'origine de cas sévères et même mortels. La plupart ont été isolées chez des sujets vaccinés, quelques-unes chez des sujets non immunisés (familles de militaires).

L'étude bactériologique a porté sur le pouvoir fermentatif vis-à-vis de certains hydrates de carbone: lactose, glucose, xylose, arabinose et dulcité; sur l'utilisation du citrate de soude sur

milieu de Simmons, la production d' $\text{H}_2\text{S}$  et la formation d'indol.

L'action sur la glycérine a été étudiée en milieu de Stern.

L'étude sérologique a consisté dans la détermination des antigènes O, H et Vi. Cette recherche a été faite sur lames avec des sérums expérimentaux provenant de l'Institut Sérothérapique de Copenhague (Kauffmann).

Enfin, la détermination des types par la méthode de Craigie et Felix, 1947, a été faite avec les préparations standard, fournies par le Dr Felix que nous remercions vivement ici (Central Enteric Reference Laboratory and Bureau, Londres).

#### RÉSULTATS DE L'ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE ET DE L'ÉTUDE ANTIGÉNIQUE.

Toutes les souches étudiées étaient sans action sur le lactose ; elles faisaient fermenter, au contraire, rapidement et sans formation de gaz, le glucose. Aucune n'était indologène.

Toutes, à l'exception de trois, produisaient de l' $\text{H}_2\text{S}$ , en quantités plus ou moins grandes. On sait, depuis les travaux de T. Tilley, 1923, que la production d' $\text{H}_2\text{S}$  n'est pas pathognomonique de *S. typhi*. C'est ainsi que sur 33 souches étudiées par Kauffmann, 6 n'en produisaient pas. La glycérine, en milieu de Stern, n'était fermentée par aucune des souches. Elles étaient, au contraire, toutes *d*-tartrate positives. Aucun développement n'était constaté sur milieu de Simmons ; cependant, pour quelques souches, on pouvait constater au sixième ou septième jour d'observation la présence de quelques colonies grêles bleuisant légèrement le milieu.

La dulcité était fermentée tardivement (plus de quatre jours, généralement le cinquième ou sixième jour) par 19 cultures. Ce caractère indiqué par A. Klinge, 1935, n'aurait pour Kauffmann aucune importance pratique, car la fermentation de cet hydrate de carbone est très irrégulière.

La fermentation du xylose et de l'arabinose est plus intéressante à considérer. Le xylose était fermenté rapidement par 245 souches, alors que la plupart (269) étaient sans action sur l'arabinose.

Se basant sur ces propriétés, Kristensen a divisé le bacille typhique en trois types :

Le type I est arabinose négatif et xylose positif ;

Le type II arabinose négatif et xylose négatif ;

Le type III arabinose positif et xylose positif.

Le type I est de beaucoup le plus fréquent. C'est ainsi que sur 2.118 cultures étudiées par Kristensen, 1.668 étaient du type I, 449 du type II et une seule du type III.

La répartition des souches que nous avons étudiées suivant ces trois types, et par région, est indiquée dans le tableau I.



TABLEAU 1. — Répartition des types fermentatifs de Kristensen.

TYPES	FRANCE	MAROC	ALGÉRIE	TUNISIE	INDOCHINE	A. O. F.	NOUMÉA	TOTAL
I . . . . .	35	113	55	12	12	4	3	234
II . . . . .	5	18	3	3	4	2		35
III . . . . .	2	3	4	1	1			11
								280

Nous retrouvons une distribution analogue à celle qui a été donnée par Kristensen, avec une fréquence toutefois plus grande du type III.

Le type I est de beaucoup le plus souvent rencontré. Il semble d'ailleurs s'agir là d'un phénomène général que l'on retrouve chez des souches isolées dans d'autres régions. C'est ainsi que dernièrement, Attimonelli, en Italie, a pu voir la prédominance de ce type.

Nous avons pu confirmer, pour notre part, que dans les petits groupements épidémiques, toutes les souches de même origine appartenaient au même type. De même, l'étude des diverses souches isolées chez un même malade a toujours montré la constance du type fermentatif.

L'étude antigénique des souches nous a donné, dans tous les cas, la formule IX, *d*—. Deux souches, cependant, lors des premiers examens étaient dépourvues d'antigènes flagellaires : il n'y avait pas d'agglutination H, et les germes se montraient immobiles à l'examen microscopique. Ce caractère était corroboré par l'examen des cultures en milieu de Tittsler et Shandolzer. Cependant, après quelques repiquages, on pouvait observer une agglutination avec le sérum *d*, et les germes montraient une certaine mobilité. D'après A. Felix, 1924, W. Hayes et F. Freeman, 1946, de telles constatations sont loin d'être rares, au cours des premiers isollements.

La présence de l'antigène Vi a été recherchée avec un sérum expérimental Vi. Toutes les souches, à l'exception d'une, possédaient cet antigène, en plus ou moins grande abondance. Certaines d'entre elles étaient, lors des premiers examens, non agglutinables sur lames avec un sérum anti-O en raison de la présence de l'antigène Vi en quantité maximum.

La plupart des souches que nous avons reçues avaient subi plusieurs subcultures au cours desquelles elles avaient pu perdre partiellement leur antigène Vi ; ces cultures étaient agglutinables sur lames à la fois par le sérum anti-O et par le sérum anti-Vi.

RÉSULTATS DE LA DÉTERMINATION DES TYPES  
PAR LES BACTÉRIOPHAGES Vi.

La technique décrite avec précision par Craigie et Felix, 1947, consiste à ensemencer la surface d'une boîte de gélose avec une anse de platine chargée d'une suspension de la souche à iden-

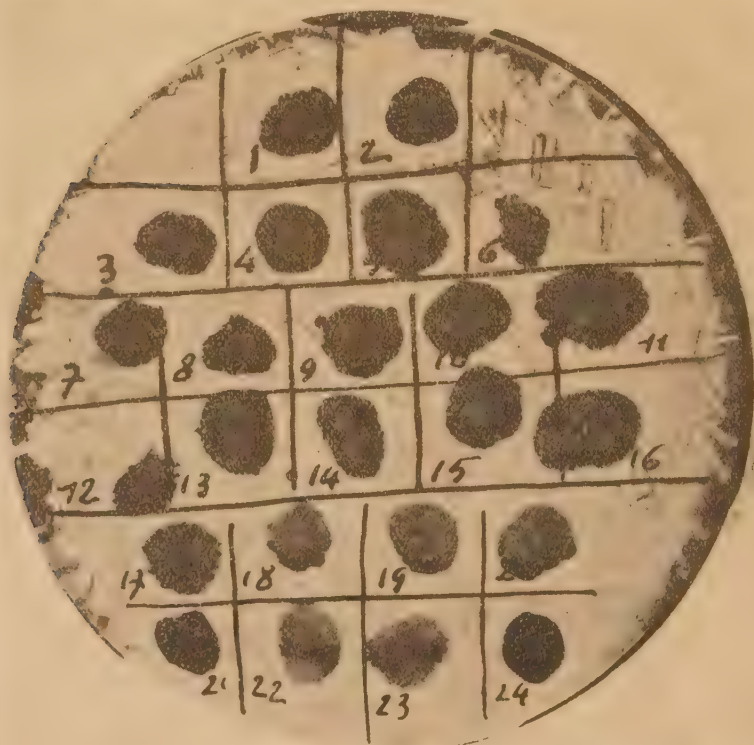


FIG. 1. — *Salm. typhi*, type A. Les numéros correspondent aux phages Vi spécifiques dans l'ordre où ils figurent sur le tableau I. Les b. typhiques du type A sont lysés, non seulement par le phage A (n° 1 de la figure), mais aussi par *tous* les autres phages.

tifier. On étale avec l'anse la gouttelette de suspension de manière à donner à la surface à ensemencer la dimension d'une pastille de 0,5 cm. de diamètre. Après absorption du liquide par la gélose, on dépose sur l'emplacement de chaque pastille avec l'anse de platine calibrée une gouttelette de chaque phage amené à la dilution critique. Cette dilution critique est la plus grande dilution qui, sur la souche type correspondante, donne encore la lyse



totale. La lecture se fait après huit heures d'étuve à 37° C ; une seconde lecture après vingt-quatre heures confirme les résultats.

La principale difficulté de la méthode consiste dans la détermination de la dilution critique. Les résultats peuvent être complètement faussés si la dilution est trop faible ou trop forte.

Nous avons apporté quelques légères modifications à la tech-



FIG. 2. — *Salm. typhi*, type D<sub>1</sub>. Les souches de ce type sont lysées par les phages du groupe D (D<sub>1</sub>, n° 6; D<sub>2</sub>, n° 7; D<sub>4</sub>, n° 8; D<sub>5</sub>, n° 9; D<sub>6</sub>, n° 10). Aucun autre phage n'agit sur elles.

nique originale, dans le but de simplifier les manipulations. Nous avons acquis la certitude que les résultats ne s'en trouvaient modifiés en aucune façon. C'est ainsi, par exemple, qu'au lieu d'ensemencer les suspensions bactériennes avec l'anse de platine, nous avons réalisé l'ensemencement de la surface entière de la gélose au moyen d'un étaleur de verre (fig. 1, 2, 3 et 4).

Les auteurs de la méthode ont insisté, avec raison, sur la très grande importance du milieu gélosé. Ils recommandent l'emploi

d'un bouillon à digestion trypsique, ou à son défaut, d'un bouillon commercial standardisé (Bacto-Nutrient broth dehydrated Difco).

Il ne nous a pas été possible, jusqu'à présent, de nous procurer régulièrement ce milieu. Après quelques tâtonnements, nous avons adopté le milieu suivant, qui nous a donné satisfaction :

Peptone Vaillant 5 B . . . . .	20 g.
Gélose . . . . .	15 g.
NaCl . . . . .	5 g.
Eau bidistillée . . . . .	1.000 g.

pH = 7 à 7,2

#### RÉSULTATS.

a) RÉSULTATS GLOBAUX DE LA CARACTÉRISATION DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES. — Sur 280 souches soumises à la méthode, 207 seulement ont pu être classées suivant l'un des 24 types de Craigie

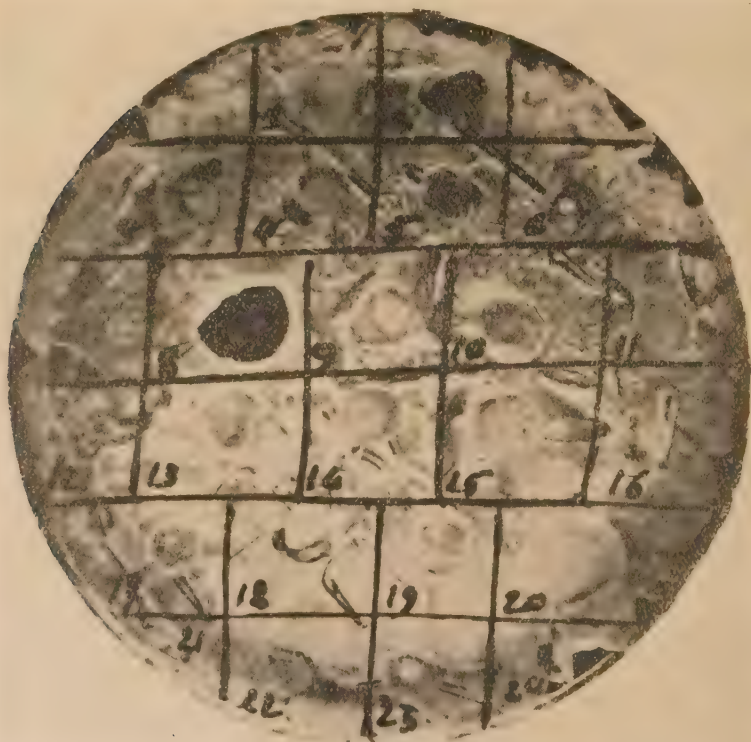


FIG. 3. — *Salm. typhi*, type D<sub>4</sub>.  
Seul le phage D<sub>4</sub> (n° 8) agit sur les souches de ce type.



et Felix ; 73 souches sont donc non caractérisables. Ce nombre paraîtra élevé, mais plusieurs d'entre elles (37) avaient été classées primitivement par nous dans les types B (12 du type B<sub>1</sub>, 5 du type B<sub>2</sub> et 20 du type B<sub>3</sub>). Nous avons envoyé ces souches au Laboratoire de référence de Londres et le Dr Felix nous a conseillé de les considérer actuellement, en raison de leurs réactions hétérologues, comme des souches Vi non caractérisables ou souches Vi dégradées.

La lecture du tableau II montre que la fréquence globale des types suit l'ordre suivant : E<sub>1</sub>, A, D<sub>1</sub>, C, D<sub>4</sub>, L<sub>2</sub>. Tous les autres types sont sensiblement plus rares. Les types B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> (avec la restriction signalée plus haut), E<sub>2</sub>, M et O n'ont pas été rencontrés jusqu'à présent.

TABLEAU II. — Répartition géographique des types bactériophagiques Vi et des types fermentatifs (Kristensen) de *Salmonella typhi*.

Types Vi Phage	France			Algérie			Maroc			Tunisie			Indo-Chine			A.O.F.			Roumélie			Total
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
A	5	2		25		1	5	7		1			1									47
B <sub>1</sub>																						
B <sub>2</sub>																						
B <sub>3</sub>																						
C	2			4			11	1														17
D <sub>1</sub>	1		2			1	26			1						1						32
D <sub>2</sub>													1									2
D <sub>4</sub>	2			2			6															10
D <sub>5</sub>							1															1
D <sub>6</sub>							1															1
E <sub>1</sub>	12			16		1	28		1	1			1	3		1	1	1		3		69
E <sub>2</sub>																						
F <sub>1</sub>	2			1			1															4
F <sub>2</sub>										2												2
G											1											1
H											1											1
I													1									1
J																						
K						1	2															3
L <sub>1</sub>							2			1												3
L <sub>2</sub>							2															2
M							2															2
N	1																					1
O																						
no	9	3		6	3		26	10	1	2			6	4		2	1					73
	35	5	2	55	3	4	113	18	3	12	3	1	12	4	1	4	2		3			280
	42			62			134			16			17			6			3			

no = souches non caractérisables

b) RÉSULTATS PAR PAYS. — L'ordre de fréquence n'est pas tout-à-fait le même suivant les régions considérées. Ainsi, pour la France, cet ordre décroissant est le suivant : E<sub>1</sub>, A, D<sub>1</sub>, D<sub>4</sub> et F<sub>1</sub>, C, D<sub>2</sub> et N ; pour l'Algérie : A, E<sub>1</sub>, C, D<sub>4</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>5</sub> et K ; pour le Maroc : E<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, C, A, D<sub>4</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>1</sub>, K, D<sub>6</sub>, F<sub>1</sub>. Le nombre des souches provenant des autres territoires est trop faible pour permettre des conclusions.

Nous ne donnons pas de pourcentage de fréquence, car le nombre des souches examinées est relativement peu élevé et, d'autre part, des groupements épidémiques peuvent attribuer à certains types une importance toute fortuite.

L'ordre de fréquence offre toutefois un certain intérêt, car il semble variable suivant les pays. C'est ainsi qu'en Palestine les types les plus fréquents sont A et C (Olitzki et collab., 1948) ; au Canada, ce sont les types E, C et A (J. M. Desranleau, 1947) ; aux Etats-Unis, dans les Etats de l'Ouest : E<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>, A, B<sub>2</sub>, C, B<sub>1</sub>,



FIG. 4. — *Salmon. typh.*, type E<sub>1</sub>. Sur les souches de ce type, seuls les phages E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub> (n° 11 et 12) donnent la lyse confluyente. Ce type est le plus fréquemment rencontré.

D<sub>1</sub> (Lazarus, 1940) et dans l'Etat de Georgie : A, E et C (Morris, Brien et Sellers, 1945).

c) TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES ET TYPES KRISTENSEN. — En combinant les types bactériophagiques avec les types de Kristensen, on obtient les subdivisions suivantes :



TABLEAU III. — Types bactériophagiques Vi et types fermentatifs de Kristensen.

TYPES de ristensen	TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES Vi																		TOTAL	
	E <sub>1</sub>	A	D <sub>1</sub>	C	D <sub>4</sub>	D <sub>6</sub>	L <sub>2</sub>	F <sub>1</sub>	K	L <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>5</sub>	G	H	J	N	T		nc
.....	66	36	29	16	10	5	5	4	2	2	2	2	1			1	1	1	51	234
.....		10		1		1													21	35
.....	3	1	3			1			1	1				1	1				1	11
Total. .	69	47	32	17	10	7	5	4	3	3	2	2	1	1	1	1	1	1	73	280

Ces combinaisons permettent d'obtenir une différenciation plus poussée, d'où un plus grand nombre de types. Nous examinerons plus loin la valeur épidémiologique de ces subdivisions.

d) VALEUR DE LA MÉTHODE DE CARACTÉRISATION DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES. — Nous avons obtenu à plusieurs reprises des souches provenant de petits groupements épidémiques distincts (P. Nicolle et A. Jude, 1949). Toutes les souches d'un même groupement appartenaient à un même type : 7 cas à Arzew : type E<sub>1</sub> ; 3 cas à Alger : type C ; 12 cas à Tiaret : type A, 4 cas à Tlemcen : type E<sub>1</sub>.

La caractérisation des types a permis d'exclure du foyer d'Arzew une infection concomitante avec un bacille du type D<sub>4</sub> et du foyer d'Alger le cas d'un infirmier porteur du type D<sub>1</sub>, dont l'infection ne pouvait par conséquent pas être attribuée à une contamination par les malades du type E<sub>1</sub> qu'il soignait.

Elle a permis de rattacher au foyer de Tiaret le cas, observé à Toulouse, d'un permissionnaire porteur du type A.

e) INTÉRÊT DE LA COMBINAISON DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES ET DES TYPES DE KRISTENSEN. — Tous les groupements épidémiques que nous avons étudiés appartenaient chacun à un même type Kristensen, ce qui est en accord avec l'opinion de Kristensen lui-même et celle d'Olitzki et collab. qui, par ce moyen, ont pu distinguer divers foyers épidémiques dans une région où les types A et C sont rencontrés presque exclusivement.

En se basant sur ces faits, on pourrait donc, dans le cas des types les plus fréquents, donner une signification épidémiologique aux sous-types Kristensen à l'intérieur d'un type bactériophagique.

RÉSUMÉ. — La méthode de Craigie et Felix permet de distinguer 24 types de *Salmonella typhi*. Ces types sont stables et leur détermination a une grande valeur épidémiologique.

L'ordre de fréquence de ces divers types varie suivant les territoires. D'une façon générale, les types E<sub>1</sub> et A ont été, à peu près partout, les plus fréquents.

Cependant, la détermination complémentaire des types fermentatifs d'après Kristensen à l'intérieur de chacun de ces types bactériophagiques semble permettre une distinction ayant une signification épidémiologique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ATTIMONELLI (R.). *Giorn. Batt. e. Immunol. ital.*, 1947, **31**, 197.  
CRAIGIE (J.) et YEN (C. H.). *Canad. publ. Hlth. J.*, 1938, **29**, 448 et 484.  
CRAIGIE (J.) et FELIX (A.). *Lancet*, 1947, **1**, 823.  
DESRAULEAU (J. M.). *Canad. J. publ. Hlth.*, 1947, **38**, 343.  
FELIX (A.). *J. Immunol.*, 1924, **9**, 115.  
HAYES (W.) et FREEMAN (F.). *J. Royal Army Med. Corps*, 1946, **87**, 118.  
KAUFFMANN (F.). *Die Bakteriologie der Salmonella Gruppe*, 1941.  
KLINGE (A.). Cité par Kauffmann, 1941.  
KRISTENSEN (M.). *J. Hyg.*, 1938, **38**, 688.  
LAZARUS (A. S.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, **45**, 400.  
MORRIS (J.), BRIEU (A.) et SELLERS (T.). *J. infect. Dis.*, 1945, **77**, 25.  
NICOLLE (P.) et JUDE (A.). *La Presse Méd.*, 1949, n° 35, 481.  
OLITZKI (A. L.), SHELUBSKY (M.) et STRAUSS (W.). *Harefuah*, Tel Aviv, 1948, 107.  
REUL. *Soc. Belge Med. Trop.*, 1949 (à paraître).  
TILLEY (T.). *J. Bact.*, 1923, **8**, 115.  
YEN (C. H.). *Chin. Med. J.*, 1940, **57**, 656.

## THYMOL, BACTÉRIES ET BACTÉRIOPHAGES

par R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE (\*).

(Institut Pasteur.)

Le thymol est un antiseptique assez peu étudié, car son emploi est limité, du fait qu'il est solide à la température ordinaire et très peu soluble dans l'eau (0,83 g. à 0,76 g. par litre, d'après le *Traité de Pharmacie Chimique* de Lebeau).

Cependant nous avons indiqué, dans des publications précédentes, que les bactériophages sont très résistants au thymol et que cet antiseptique peut être utilisé pour assurer la stérilité des lysats [5, 6, 7].

Nous avons pensé que cette particularité du thymol méritait de retenir l'attention, et nous étudions dans le présent travail l'action du thymol, d'une part sur les bactéries et sur les phages pris chacun isolément, d'autre part, sur la multiplication du bactériophage dans une culture du germe et sur la lyse de cette culture.

*Technique.* — La souche de *Sh. paradysenteriae* Flexner Y6R, entretenue sur milieu synthétique et le phage C16 ont servi aux expériences fondamentales. Les ensemencements sont faits en milieu synthétique à partir d'une culture de dix-huit heures contenant  $8 \times 10^8$  germes viables par centimètre cube.

Des vérifications nombreuses de certains résultats ont été faites sur diverses souches de Salmonelles, de Streptocoques, de Staphylocoques, et sur des phages bien adaptés à ces souches.

On a utilisé, dans chaque cas, le milieu que l'expérience a montré comme le plus approprié à la fois à la culture de la bactérie, à la multiplication du phage et à la conservation de ces deux éléments ; notre milieu synthétique habituel [5] pour la souche Y6R avec le phage C16 ; l'eau peptonée, le bouillon, ou l'hydrolysate de caséine additionné de divers éléments, dans d'autres cas. L'avantage de milieux synthétiques est évident, même pour l'étude de l'action du thymol sur le germe ou sur le phage pris chacun isolément.

Le thymol est introduit dans les tubes ou flacons en expérience sous forme d'un cristal, qu'on y laisse en permanence. Le nombre de bactéries « viables » par centimètre cube est calculé par la

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 avril 1949.



méthode de numération (après quarante-huit heures d'étuve) des colonies sur plaques de gélose et le nombre de bactériophages par celle de numération des plages. Les titrages sont toujours faits en double ou en triple.

### I. — Action du thymol sur les bactéries.

Le thymol est bactériostatique et bactéricide.

#### a) ACTION BACTÉRIOSTATIQUE.

Des expériences préalables ont montré qu'en ensemençant 10 cm<sup>3</sup> de milieu synthétique avec des quantités de bactéries Y6R de 250 par centimètre cube à  $8,5 \times 10^7$  par centimètre cube, on obtient au bout de vingt-quatre heures une culture abondante. Un ensemençement de 2 à 200 bactéries par centimètre cube donne encore un trouble net au bout de vingt-quatre heures et une culture abondante en deux ou trois jours.

L'introduction de thymol dans une culture de Y6R en milieu synthétique en pleine multiplication (ayant séjourné une heure à 37°), quelle qu'ait été la quantité de germes ensemençés, arrête d'emblée, dans presque tous les cas, toute multiplication : l'action bactériostatique est absolue et le nombre de germes viables n'augmente à aucun moment. D'abord stationnaire pendant une courte période, il diminue ensuite très rapidement.

Dans quelques cas exceptionnels, nous avons observé au début une certaine multiplication. Il s'agissait toujours de cas où il y avait très peu de germes au départ : par exemple, une culture ensemençée avec 9 bactéries vivantes en contenait 42 au bout de trois heures ; peu de temps après, elle n'en contenait plus.

#### b) ACTION BACTÉRICIDE.

Nous avons étudié cette action en déterminant le nombre de bactéries « viables » par numération des colonies sur plaques de gélose, à différents temps, dans un milieu de culture synthétique.

Au point de vue pratique, deux points sont importants : 1° la marche de la stérilisation, 2° le temps nécessaire pour la stérilisation totale. Nous les avons étudiés à +37° et à +4°.

#### ACTION BACTÉRICIDE A 37°.

1° *Marche de la stérilisation.* — L'action bactéricide du thymol à 37° suit une certaine progression. On peut faire varier l'ensemencement initial dans de larges limites sans la modifier sensiblement (tableau I). Autrement dit, le nombre de bactéries survivant

pour cent à un instant donné est le même, quel que soit l'ensemencement initial, si toutes les autres conditions sont les mêmes. Le tableau I le montre pour les conditions que nous utiliserons habituellement dans ce travail : cultures agitées au bain-marie à 37° : ensemencement avec une culture de dix-huit heures dans le même milieu.

Le thymol est introduit après une heure de séjour à 37°, en période de croissance logarithmique.

Ce n'est que pour des ensemencements très abondants ou très faibles qu'on observe quelques irrégularités sur lesquelles nous reviendrons un peu plus loin.

TABLEAU I.

GERMES AU DÉPART par centimètre cube	SURVIVANTS % AU BOUT DE					
	1/4 d'heure	1/2 heure	1 heure	2 heures	3 heures	5 heures
$3,6 \times 10^7$ . . . . .	100	0,4	0,2	0,2	0,2	
$1,8 \times 10^7$ . . . . .		2	0,2	0,2	0,2	0
$1,8 \times 10^6$ . . . . .		2	2	0,2	0,2	0
$6,3 \times 10^4$ . . . . .	100					
$1,8 \times 10^4$ . . . . .		0,4	0,2	0,2	0,2	0
$4,2 \times 10^3$ . . . . .	100					
180 . . . . .		5	1	1	1	0
Moyennes. . . . .	100	1,9	0,7	0,36	0,36	
Ecart types. . . . .		1,86	0,8	0,36	0,36	
$\chi^2$ . . . . .		7,3	3,6	1,37	1,37	

Si, pour chaque temps, on calcule la moyenne des expériences, l'écart type (1) et le coefficient  $\chi^2$  (2), on voit que les écarts ne sont pas significatifs et qu'on est en droit de tracer une courbe unique de destruction, valable pour des quantités de germes comprises dans un très large intervalle (fig. 1). On y note les trois phases suivantes : un temps de latence d'un quart d'heure environ ; une phase de destruction très rapide (98 p. 100 des germes sont détruits entre un quart d'heure et une demi-heure). une phase de destruction lente des 2 p. 100 survivants.

(1) L'expérience correspondant à l'ensemencement le plus faible est un peu aberrante, la destruction des germes étant au début un peu plus lente, ce qui rend compte de la valeur plus élevée du premier écart-type.

(2) D'après les tables in : R. A. Fischer, *Statistical methods for research workers*. Oliver and Boyd. Edimburgh.



On remarquera que cette courbe diffère beaucoup de la courbe de destruction de bactéries par un antiseptique très soluble (sublimé ou formol par exemple). Celle-ci est une courbe exponentielle, montrant que la quantité de bactéries tuées par unité de temps est constante. La quantité d'antiseptique dissous étant alors très grande par rapport à la quantité nécessaire à la mort des germes, les conditions restent les mêmes pendant toute l'expérience.

La solubilité du thymol étant très faible, tout le thymol en solution au début se fixe probablement sur les germes et de nouvelles quantités de l'antiseptique se mettent en solution jusqu'à saturation de tous les germes. Ceci répond peut-être à la période

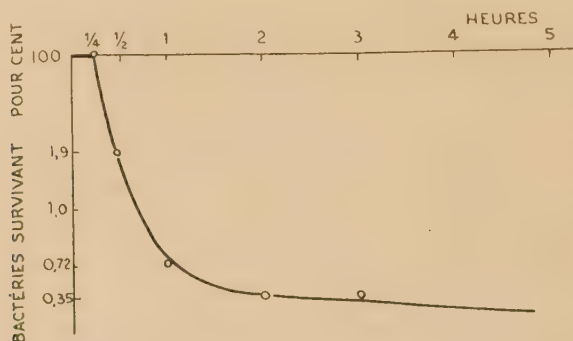


Fig. 1. — Action du thymol sur *Sh. paradysenteriae* Y6R.  
Courbe de survie en coordonnées semi-logarithmiques.

latente d'un quart d'heure. A la fin de celle-ci les bactéries sont tuées presque instantanément, sauf pour un reliquat qui paraît plus résistant.

Pour un nombre de germes très grand ( $5 \times 10^8$  par centimètre cube), dans les mêmes conditions, le pourcentage de survivants diminue relativement plus vite que pour des quantités moyennes ; mais il faut attendre beaucoup plus longtemps, comme nous le verrons, pour que tous les germes soient tués.

Il faut naturellement peu de temps (deux à trois heures au plus) pour tuer un très petit nombre de bactéries (moins de 100 par centimètre cube). Mais la stérilisation progresse moins régulièrement, le pourcentage de bactéries détruites pendant la première demi-heure ou la première heure étant parfois très faible.

2° *Temps de stérilisation totale.* — Au point de vue pratique, il est important de savoir préciser le temps qu'il faut pour stériliser complètement une culture ou une suspension de bactéries. Ce temps dépend du milieu, de la température, du nombre de

bactéries présentes au départ et de l'état dans lequel elles se trouvent.

Etudions-le, par exemple, dans les mêmes conditions que précédemment (culture en pleine multiplication logarithmique à 37°) [tableau II].

Pour une quantité moyenne de bactéries, dans une gamme très étendue (de  $3 \times 10^7$  à 180 par centimètre cube) le temps de stérilisation est le même (environ cinq heures).

TABLEAU II.

BACTÉRIES au départ par centimètre cube	TEMPS de stérilisation
$4,6 \times 10^8$ . . . . .	> 48 heures.
$3,6 \times 10^7$ . . . . .	5 heures.
$1,8 \times 10^6$ . . . . .	5 heures.
$1,8 \times 10^4$ . . . . .	5 heures.
180 . . . . .	5 heures.
18 . . . . .	< 2 heures.

Une petite quantité de bactéries n'est guère plus vite tuée qu'une quantité moyenne. Par contre, pour des quantités très petites, la stérilisation est plus rapide, mais moins régulière.

Dans les suspensions denses (plus de  $10^8$  germes par centimètre cube), bien que le pourcentage de germes tués au début soit au moins aussi grand que pour les suspensions moyennes, la stérilisation totale est longue à obtenir. Nous avons souvent constaté, surtout en l'absence d'agitation, qu'au bout de quarante-huit heures, il reste quelques bactéries vivantes (1 p. 200.000). La cause en est probablement que l'antiseptique atteint difficilement les bactéries qui forment un dépôt abondant au fond du tube. En agitant les suspensions, on obtient plus vite la stérilisation.

#### ACTION BACTÉRICIDE A LA GLACIÈRE.

L'action bactéricide non seulement est plus lente à la glacière, mais elle ne progresse pas avec la même régularité. Plusieurs suspensions contenant le même nombre de bactéries ne présentent pas le même pourcentage de bactéries détruites dans le même temps. Il est impossible d'établir des courbes. Le dépôt des bactéries au fond du tube paraît jouer un rôle analogue, mais plus important à cause de la lenteur de l'action, et l'impossibilité d'agiter les suspensions.

Dans l'ensemble l'action est très lente au début. Au bout de quatre heures, la proportion de bactéries tuées est insignifiante. Il y a, comme à 37°, une période latente, mais beaucoup plus longue. Au bout de vingt-quatre heures, les résultats sont très variables. Parfois il ne reste plus de germes vivants, parfois il en



TABLEAU III. — Action du thymol à la glacière.

BACTÉRIES AU DÉPART par centimètre cube	BACTÉRIES SURVIVANTES POUR CENT à différents temps			
	4 heures	7 heures	24 heures	48 heures
$6,6 \times 10^8$ . . . . .			3	0,00015
$2 \times 10^8$ . . . . .			5	
$2,5 \times 10^7$ . . . . .	3	3	0	
$2,1 \times 10^7$ . . . . .			35	0,05
$2,1 \times 10^7$ . . . . .				
$2,1 \times 10^6$ . . . . .			0,04	0
$2,1 \times 10^6$ . . . . .	100		40	0
$2,1 \times 10^6$ . . . . .	66	32		
$2,5 \times 10^4$ . . . . .			25	
$2,5 \times 10^4$ . . . . .			0,7	
$2,1 \times 10^4$ . . . . .	100		50	0
$2,1 \times 10^4$ . . . . .	100		70	0

reste 70 p. 100 sans qu'un rapport apparaisse entre le pourcentage de bactéries détruites et leur nombre initial. Il faut remarquer même que dans les premières vingt-quatre heures, la proportion des survivants est souvent plus grande avec de petites quantités de bactéries au départ. Mais ici encore il n'y a pas de régularité. Par contre, au bout de quarante-huit heures, la stérilisation est complète pour des suspensions contenant moins de  $2 \times 10^6$  bactéries par centimètre cube.

#### CONTRÔLE DE LA STÉRILISATION.

La stérilité des suspensions de germes après l'addition du thymol est vérifiée chaque fois par trois épreuves différentes : mise à l'étuve, après avoir enlevé le cristal de thymol, de 1 ou 2 cm<sup>3</sup> de la suspension ; étalement de quelques gouttes de la suspension sur une boîte de Petri ou un tube de gélose inclinée ; ensemencement de quelques centimètres cubes de bouillon avec III gouttes de la suspension. Toutes les cultures sont mises à l'étuve à 37° pendant quarante-huit heures.

Nous avons vérifié que la petite quantité de thymol restée en solution après l'enlèvement du cristal ne peut pas empêcher la multiplication de bactéries vivantes.

Au point de vue pratique il faut retenir que la stérilisation pour des quantités de germes inférieures à  $10^7$  par centimètre cube est complète en cinq heures à 37° et en quarante-huit heures à la glacière. Pour des quantités supérieures à  $10^7$ , il faudra attendre un temps plus long, et ce temps est assez variable ; parfois il reste quelques bactéries vivantes pendant un temps très long, dans ce dernier cas.

## II. — Action sur les bactériophages.

Les bactériophages, en l'absence de bactéries sensibles (3), en particulier dans les lysats qui ne contiennent plus que des bactéries résistantes, ne sont pas inactivés par le thymol, ni à 37°, ni à 4°, même après contact prolongé.

Une application très intéressante de ce fait est la stérilisation des lysats bactériophagiques par l'action du thymol sur les germes résistants qu'ils contiennent toujours. Ceux-ci sont peu nombreux (1.000 à 10.000 par centimètre cube) quand la lyse a été complète. Si, au contraire, la culture secondaire résistante est abondante, il suffit de se débarrasser de la plus grande partie des germes, par centrifugation, pour être ramené au cas précédent.

Nous avons vu que de telles quantités de germes sont tuées en quarante-huit heures. Pour plus de sûreté, nous laissons toujours le lysat trois jours à la glacière avec le thymol, et nous avons vérifié de nombreuses fois, par toutes les méthodes indiquées ci-dessus, que les lysats étaient parfaitement stériles. Par contre, le titre du phage restait inchangé.

Nous avons eu le même succès avec les bactériophages et les espèces bactériennes les plus variés : streptocoques, staphylocoques, salmonelles (*B. typhiques*, *paratyphiques*, *typhi murium*, etc.), *S. dysentérique*, *E. coli*, etc., et dans les milieux de cultures les plus divers : bouillon, eau peptonée, hydrolysats de caséine, milieux synthétiques.

Nous utilisons couramment cette méthode pour stériliser les lysats utilisés pour les « typing » des bactéries, les injections aux animaux, les essais thérapeutiques chez l'homme.

On évite ainsi les pertes en phages, constantes au cours des filtrations, quel que soit le filtre bactériologique employé. En effet, nous avons constaté que les filtrations sur bougie amènent une baisse de l'ordre de 85 p. 100 du titre des lysats en bouillon, et de 100 p. 100 des lysats en milieu synthétique. Dans ce dernier cas, il faut utiliser le filtre bactériologique en verre fritté, qui amène d'ailleurs aussi une baisse de titre.

## III. — Action du thymol sur les différents temps de la bactériophagie.

### I. — FIXATION DU PHAGE SUR LA BACTÉRIE.

En introduisant un cristal de thymol avant le bactériophage dans une culture en plein développement, on peut étudier l'action de cet antiseptique sur la fixation du phage sur le germe.

(3) Nous verrons plus loin qu'en présence de bactéries sensibles il peut y avoir une inactivation apparente des phages par fixation de ceux-ci sur les bactéries thymolées.

Les bactéries tuées par le thymol sont encore capables de fixer le phage, mais perdent immédiatement la propriété de se multiplier. Des expériences préalables ont déterminé le temps de fixation de C16 sur Y6R.

On introduit des bactériophages dans 10 cm<sup>3</sup> d'une suspension contenant  $24 \times 10^6$  bactéries par centimètre cube (provenant d'une culture de cinq heures). On prélève dans des temps successifs III gouttes du mélange qu'on dilue à  $10^{-2}$  dans de l'eau glacée, qu'on centrifuge. On dilue le surnageant à  $10^{-4}$  et on y titre le phage. On obtient par différence la quantité de phage fixé.

Le tableau IV montre la fixation du phage sur les bactéries non thymolées. Une grande partie des phages est déjà fixée dans les deux premières minutes ; la fixation se complète au cours des dix premières minutes. Ajoutons que, au bout de quinze à vingt minutes, quelques phages nouveaux commencent à se libérer. La libération est complète au bout de trente minutes.

TABLEAU IV.

Exp. : Phages au départ par centimètre cube. . . . .	$17 \times 10^6$
Bactéries — — — — —	$24 \times 10^6$
TEMPS	PHAGES FIXÉS POUR CENT
2 minutes. . . . .	83
5 minutes. . . . .	83
8 minutes. . . . .	96,5
11 minutes. . . . .	> 98,3
17 minutes. . . . .	96,5

Les phages se fixent encore sur les bactéries atteintes par le thymol, mais la fixation est plus lente et elle n'est pas suivie de libération de phages. Quand le thymol est introduit en même temps que le phage, la fixation est plus complète que quand il a été introduit une heure plus tôt (tableau V).

TABLEAU V.

Exp. : Phages au départ par centimètre cube. . . . .	9 × 10 <sup>6</sup>		
Bactéries — — — — —	90 × 10 <sup>6</sup>		
PHAGES FIXÉS POUR CENT			
TEMPS	Témoin	Thymol en même temps que le phage	Thymol une heure avant
6 minutes . . . . .	64	67	78
10 minutes . . . . .	70	67	73
15 minutes . . . . .	40	96,7	73

Ici la libération des nouveaux phages était commencée au bout de quinze minutes dans le témoin.



## II. — MULTIPLICATION DES PHAGES.

Il résulte, de ce qui précède, que le thymol introduit dans une culture de Y6R contenant des phages C16 et placée à 37° n'inactive pas les phages mais tue les bactéries très rapidement. Par ailleurs, les bactéries tuées par le thymol peuvent encore fixer les phages.

Il était indiqué d'utiliser ces propriétés très particulières du thymol pour l'étude de la multiplication des phages dans une culture de bactéries.

Cette étude est surtout intéressante si le nombre de phages au départ est petit par rapport au nombre de bactéries et si celles-ci sont en pleine multiplication quand on introduit le phage. En effet, plus le nombre de phages approche le nombre de bactéries, plus vite la multiplication de celles-ci est arrêtée.

Par ailleurs, des expériences de cet ordre, qui doivent être répétées à des jours différents, nécessitent des précautions dans l'entretien du phage et de la souche microbienne, car l'un et l'autre pourraient subir des mutations qui modifieraient complètement leurs caractères de croissance. Ces mutations sont particulièrement faciles à éviter pour cette souche et ce phage, qui sont relativement stables.

Les expériences ont été conduites de la façon suivante : une série de petits ballons tous semblables, contenant 10 cm<sup>3</sup> de milieu, placés dans un agitateur au bain-marie à 37°, reçoivent chacun 0,3 cm<sup>3</sup> d'une culture de dix-huit heures de la souche Y6R, faite dans le même milieu et, une heure plus tard, environ 1.000 phages par centimètre cube provenant d'un lysat récent. A ce moment, en milieu synthétique, elle contient environ 30 millions de bactéries vivantes par centimètre cube.

Toutes les demi-heures, on prélève dans un autre ballon un échantillon de la culture. Dans certaines expériences, on y fait une numération des germes « viables » (c'est-à-dire, dans le cas actuel, non encore atteints par le phage), dans d'autres un titrage de phages.

Pour dénombrer les germes viables, le phage est d'abord inactivé dans l'échantillon prélevé, par addition de sérum spécifique. Le nombre des germes « viables » y est ensuite déterminé par la méthode des numérations de colonies sur gélose. Les nombres de phages indiqués sur les tableaux (VI et VII) sont donnés par la numération des plages obtenues en étalant avec une suspension dense du germe sensible une dilution convenable de la culture. Ces plages correspondent aux « centres infectieux » dont certains sont donnés par un phage libre, d'autres par une bactérie parasitée (le phage s'y trouvant à un stade plus ou moins avancé de multiplication). Nous verrons plus loin l'importance

de cette distinction. Aussitôt le prélèvement fait, on introduit dans le ballon un cristal de thymol. Un des ballons de la série ne reçoit pas de thymol et sert de témoin. Le phage y sera titré dès que la culture qu'il contient sera lysée, ce qui marquera la fin de l'expérience.

Dès qu'une culture a reçu du thymol, son opacité cesse d'augmenter. Celles qui reçoivent pendant la première heure le thymol gardent constamment la même opacité. On y titre le phage à la fin de l'expérience. Dans celles qui ont reçu le thymol plus tard, on observe après un certain temps un éclaircissement. Plusieurs expériences de ce type ont été faites avec des résultats toujours identiques.

Les tableaux suivants rendent compte de deux d'entre elles. Dans l'une, chaque addition de thymol a été précédée d'une numération des germes viables (tableau VI), dans l'autre, d'un titrage de phages (tableau VII).

TABLEAU VI.

Exp. : Phages au départ par centimètre cube. . . . . 1.000  
Bactéries. — — — — —  $33 \times 10^6$

TEMPS D'ADDITION du thymol	BACTÉRIES VIALLES par centimètre cube avant thymol	PHAGES par centimètre cube après thymol	TEMPS DE LYSÉ
30 minutes . . .	$31 \times 10^6$	$1 \times 10^4$	Pas de lyse apparente.
1 heure . . . . .	$40 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	Pas de lyse.
1 h. 30 . . . . .	$36 \times 10^6$	$3 \times 10^7$	Lyse partielle.
2 heures . . . . .	$9 \times 10^6$	$4 \times 10^8$	2 h. 30.
2 h. 30 . . . . .	$1,2 \times 10^5$	$5 \times 10^9$	2 h. 50.
3 heures . . . . .	$1 \times 10^4$	$6 \times 10^9$	3 h. 15.
3 heures 20 . . .	$1 \times 10^4$	$9 \times 10^9$	3 h. 30.
Pas de Thymol		$1 \times 10^{10}$	3 h. 45

TABLEAU VII.

Exp. : Phages au départ par centimètre cube. . . . . 1.500  
Bactéries — — — — —  $24 \times 10^6$

TEMPS D'ADDITION du thymol	PHAGES avant thymol	PHAGES après thymol	TEMPS DE LYSÉ
0 minute . . . . .	1.500	60	Pas de lyse.
30 minutes . . . . .	$5 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	Pas de lyse.
1 heure . . . . .	$2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	Pas de lyse.
1 h. 30 . . . . .	$1,2 \times 10^6$	$9 \times 10^5$	Lyse partielle.
2 heures . . . . .	$2,6 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	2 h. 35.
2 h. 30 . . . . .	$2,6 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	2 h. 55.
3 heures . . . . .	$5 \times 10^9$	$5 \times 10^9$	3 h. 25.

Ces expériences montrent les faits suivants :

1° Le thymol n'inactive pas les phages dans ces conditions.

Quand le thymol est ajouté en même temps que le phage dans la culture, on observe une diminution du nombre de phages. Elle doit être attribuée surtout à une fixation des phages sur les bactéries préalablement thymolées. Nous savons que des phages ainsi fixés peuvent être, à la longue, inactivés. L'action de la température peut aussi pour une part être responsable de cette inactivation ; car le titrage a été fait à la fin de l'expérience, après un séjour de la culture à 37° pendant quatre heures et demie.

Quand le thymol est ajouté après le phage, le nombre de phages reste à peu près constant, après cette addition. Les très légères différences avec les chiffres antérieurs à l'introduction du thymol ne sont pas significatives.

Rappelons que, à partir de la première fixation de phages qui a lieu dans les deux à huit premières minutes, les phages dénombrés par les titrages sont les uns libres, les autres fixés sur une bactérie. Leur proportion respective varie constamment, puisque les phages fixés se multiplient pour donner de nouveaux phages qui sont libérés par la bactérie et vont ensuite se fixer sur des bactéries viables, tant qu'il en reste.

Le temps nécessaire à la fixation d'un phage C16 libre sur Y6R est, nous l'avons dit, deux à huit minutes. Sa multiplication sur la bactérie dure environ vingt minutes. La probabilité pour qu'il y ait plus de phages fixés que de phages libres dans les premières phases de la multiplication est donc grande. Mais aucune précision ne peut être donnée sur ce point. Il est donc impossible de décider actuellement si le thymol inactive ou non des phages déjà fixés. De nouvelles expériences seront nécessaires.

2° Le thymol arrête immédiatement et totalement la multiplication des phages. Il faut remarquer que les phages fixés se trouvent, au moment de l'addition du thymol, à différents stades de cette multiplication. Non seulement le thymol arrête complètement cette multiplication, mais encore il ne permet jamais la libération de plus d'un phage par bactérie. Et cependant, dans nombre de cas, la bactérie en aurait spontanément libéré une soixantaine quelques minutes plus tard.

Nous reviendrons plus loin sur ce point.

3° Le thymol arrête immédiatement la multiplication des bactéries. Cette action bactériostatique a été étudiée plus haut. Nous n'avons pas à y revenir.

4° Le thymol n'empêche pas la lyse des germes parasités, et même celle-ci est avancée à la suite de l'action de cet antiseptique.

Mais seuls les germes déjà parasités au moment de l'introduction du thymol se lysent, c'est ce qui explique que la lyse ne



soit pas toujours apparente. En effet, si le thymol est introduit dans la culture au cours de la première heure, on ne voit pas d'éclaircissement. Si c'est au bout d'une heure trente, la lyse porte sur un nombre de germes plus grand, et l'éclaircissement de la culture est partiel. A partir de deux heures, la lyse est totale.

C'est que, au début, il y a dans la culture très peu de phages et beaucoup de germes. Le taux de multiplication des phages étant grand, il se trouve, comme nous le verrons, un moment où la presque totalité des germes est parasitée à la fois (début de la deuxième heure). Dès lors, la lyse est totale après l'introduction du thymol.

Il existe un délai entre l'introduction du thymol et la lyse. Quand celle-ci est inapparente ou partielle, on ne peut pas préciser ce délai.

Quand la lyse est totale, on peut la repérer de façon précise : elle se produit dix à trente minutes après l'addition du thymol.

Par ailleurs, le nombre de bactéries parasitées à un instant donné est au plus égal au nombre total de « centres infectieux » indiqué par le titrage au même instant.

On voit par les tableaux que pendant la première heure ce nombre de bactéries parasitées est négligeable par rapport au nombre de bactéries « viables ».

Au bout d'une heure trente, il atteint à peu près celui des bactéries viables. Au bout de deux heures, le nombre des bactéries viables a beaucoup diminué. Si elles étaient seules, elles ne détermineraient pas d'opacité du milieu. La forte opacité qu'on observe à ce moment est entièrement due aux germes parasités.

5° La lyse après l'introduction du thymol est plus précoce que la lyse spontanée. (Celle-ci se produit en trois heures trente à quatre heures trente). Elle est d'autant plus rapide que le thymol a été introduit plus tôt. Elle n'est pourtant pas immédiate et le temps écoulé entre l'introduction du thymol et la lyse paraît d'autant plus court que cette introduction a été plus tardive. Mais ce temps de latence n'excède pas trente-cinq minutes. Elle suit de près l'action léthale du thymol sur la bactérie, qui se produit au bout d'un quart d'heure environ.

### Discussion de l'action du thymol sur la bactériophagie.

Pour essayer d'expliquer ce qui se passe après l'addition de thymol, nous avons repris en détails *l'étude quantitative de la bactériophagie*, en traçant pour chaque expérience trois courbes, que nous appellerons courbes de *viabilité des bactéries*, d'*opacité* et de *multiplication des phages*.

Les expériences ont été faites dans les mêmes conditions que

les précédentes (mêmes ensemencements, même nombre de germes et de phages au départ, etc.).

Des courbes témoins de viabilité et d'opacité, données par une culture qui n'a pas reçu de phages, ont été établies pour chaque expérience.

On sait que, dès qu'une bactérie est parasitée par un phage, elle devient incapable de se multiplier. Dans les cultures infectées par le phage, il y a donc des bactéries dans trois états différents : les unes, que nous appellerons viables, ne sont pas contaminées par le phage ; d'autres, non viables, sont parasitées ; enfin il existe quelques bactéries mortes. Celles-ci sont en quantité négligeable pendant la phase de croissance logarithmique des bactéries.

#### COURBES DE VIABILITÉ.

Elles comportent trois parties, qui sont respectivement : ascendante, descendante et horizontale (fig. 2).

La portion ascendante correspond à la période où le nombre

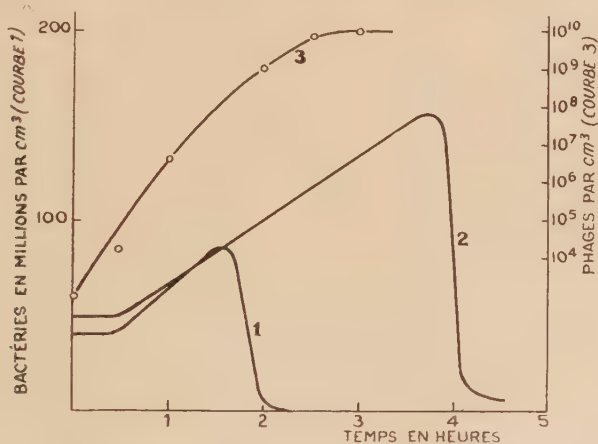


FIG. 2. — Phage C<sub>16</sub> sur *Sh. paradysenteriae* Y6R. Courbe 1, viabilité des bactéries ; courbe 2, opacité de la culture ; courbe 3, multiplication du phage. La courbe 3 est en coordonnées semi-logarithmiques.

de phages, bien qu'augmentant régulièrement, reste encore très inférieur au nombre de germes. A la fin de cette période (correspondant au temps de une heure trente), moins de 1/10 des germes a été parasité. La culture contient donc au moins les 9/10 des germes viables de la culture témoin. Une telle différence est dans les limites d'erreur des méthodes de titrage : les deux courbes coïncident.

La portion descendante correspond à une courte période, de

trente minutes environ, pendant laquelle les germes restés jusque-là indemnes sont presque tous parasités. C'est que, comme nous le verrons plus loin, une libération massive de phages se fait au début de cette période. Ces phages libérés sont assez nombreux pour atteindre, en un temps très court, les germes non encore parasités. A la fin de cette période, il ne reste plus que 3 p. 100 de germes « viables », c'est-à-dire non parasités (tableau VIII).

La *portion horizontale* (en réalité légèrement descendante), correspond à une période où le nombre de germes viables est très petit. Il diminue encore, jusqu'à un reliquat de bactéries résistantes (au temps de deux heures trente, il ne reste plus que 0,03 p. 100 de germes viables).

TABLEAU VIII. — Bactéries viables (en millions par centimètre cube) d'une culture ayant reçu du phage comparée à celles d'une culture témoin (4).

TEMPS	AVEC PHAGES	SANS PHAGES
0 . . . . .	37	23
30 minutes . . . . .	39	33
1 heure . . . . .	56	48
1 h. 30 . . . . .	62	58
2 heures . . . . .	5	100
2 h. 30 . . . . .	0,07	150
3 heures . . . . .	0,009	300

#### COURBES D'OPACITÉ.

Elles sont tracées avec l'électrobiophotomètre de M. Faguet, que nous remercions ici.

Elles comportent également trois parties qui sont respectivement ascendante, descendante et horizontale, mais qui ne correspondent pas dans le temps avec chacune des trois parties de la courbe de viabilité.

La *portion ascendante* coïncide presque entièrement avec la courbe d'opacité témoin (sans bactériophage).

Nous avons vu que, dans une première période, la proportion de germes atteints par le phage est trop faible pour modifier la courbe des germes viables. La même raison joue pour la courbe d'opacité, mais pendant plus longtemps, parce qu'il existe un décalage entre le moment où la bactérie est parasitée et celui où elle se lyse.

(4) La culture témoin a étéensemencée avec moins de germes que l'autre, mais la comparaison montre bien que le nombre de germes viables augmente d'abord à peu près parallèlement dans les deux cultures, puis diminue brusquement entre une heure trente et deux heures dans celle qui a reçu du phage, alors que l'autre continue sa croissance régulière.



Vers la fin de cette portion ascendante, la pente de la courbe diminue et elle se détache de la courbe témoin (non représentée sur la figure) dont la pente n'a pas changé (phase logarithmique). Ceci correspond à la lyse d'un certain nombre de bactéries.

La portion descendante correspond à une lyse massive des bactéries, dont un petit nombre seulement s'était lysé jusqu'ici. Il est évident que ce sont toutes ces bactéries parasitées presque en même temps (entre une heure trente et deux heures) qui vont se lyser plus tard, presque en même temps. Le parallélisme des portions descendantes des deux courbes (de viabilité et d'opacité) montre bien que le temps compris entre la fixation de phage sur une bactérie et la lyse de celle-ci est constant dans les conditions de l'expérience. Ce temps est indiqué avec une approximation suffisante par la différence des abscisses des points des deux courbes ayant la même ordonnée.

Ce temps est de une heure à une heure trente ; deux à trois fois le temps de multiplication du phage.

Le décalage entre la fixation massive des phages et la lyse massive des bactéries est donc plus grand que le temps de multiplication de ces phages ; ce qui ne paraît pas confirmer la notion généralement admise de la libération des phages par la lyse de la bactérie. Nous verrons que la courbe de multiplication des phages donne des indications concordantes.

Au moment de la lyse massive, les germes viables se réduisent depuis longtemps à un petit reliquat de bactéries résistantes au phage.

#### COURBES DE MULTIPLICATION DES PHAGES.

Le nombre de phages est donné par la méthode indiquée plus haut. Rappelons qu'elle indique en réalité le nombre de « centres infectieux », dont les uns sont des phages libres, les autres des bactéries parasitées.

Tant que le nombre de bactéries dépasse de beaucoup le nombre de phages, on peut sans grande erreur admettre que chaque phage se fixe sur une bactérie différente et que chaque « centre infectieux » représente soit un phage libre, soit un phage fixé en voie de multiplication.

Le nombre des phages augmente beaucoup plus vite que le nombre des bactéries, et de façon discontinue (comparer les deuxième et troisième colonnes du tableau VI). On voit qu'au bout d'une heure trente il y a, dans le cas considéré, encore dix fois plus de bactéries viables que de phages. Peu de temps après (entre une heure trente et deux heures), une brusque augmentation du nombre de phages est survenue et il y a plus de phages que de bactéries viables. Dès ce moment, il y a assez de phages

pour se fixer rapidement sur presque tous les germes sensibles et cette fixation fait perdre à ces germes leur viabilité.

Dans des conditions bien constantes (souche bactérienne et phage déterminés et ne subissant pas de mutations, milieu, température, oxygénation, etc., définis), comme celles où nous opérons, la multiplication du phage est fonction de trois données numériques : temps de fixation, taux et temps de multiplication (5). Il existe des méthodes pour les déterminer expérimentalement [4, 2].

Elles sont sujettes à des variations individuelles, mais pour une population étendue, leurs valeurs moyennes peuvent être utilisées dans les calculs comme des constantes. Ces valeurs, que nous avons déterminées pour C16 sur Y6R par plusieurs expériences, sont :

Temps de fixation, quatre minutes ;

Taux de multiplication, soixante ;

Temps de multiplication, vingt-cinq minutes.

Connaissant ces données et le nombre des phages présents au début, on peut calculer le nombre de phages qui doivent être théoriquement présents à chaque moment, tout au moins tant que le nombre de phages est encore nettement inférieur au nombre de germes viables (c'est-à-dire pendant une heure trente) [tableau IX].

En effet, on peut admettre que, dans ces conditions, chaque phage se fixe sur un seul germe et donne naissance à 60 phages vingt-cinq minutes plus tard. En tenant compte du temps moyen de fixation de cinq minutes, le nombre des phages augmentera de soixante fois toutes les demi-heures pendant une heure trente.

A ce moment le nombre de phages avoisine le nombre de germes viables, et une correction serait nécessaire pour calculer le point suivant (deux heures), car plusieurs phages peuvent se fixer sur un même germe, alors que d'autres germes peuvent ne pas être atteints encore. Il faut donc s'attendre à ce moment à ce que le chiffre calculé sur la base d'une augmentation de soixante fois toutes les demi-heures soit supérieur au chiffre observé, et c'est ce qu'on constate (tableau IX).

Par la suite, le nombre de phages dépasse de beaucoup le nombre de germes viables et le calcul devient impossible, car si, dans l'ensemble, le nombre des phages libres augmente de plus en plus, tandis que celui des phages fixés diminue, leur rapport à un instant donné est inconnu. Or, les phages fixés se multiplient

(5) Le taux de multiplication (burst size) est le nombre de phages libérés de façon explosive par un germe ayant fixé un phage. Le temps de multiplication est le temps écoulé entre la fixation d'un phage sur un germe et la libération de phages nouveaux.

TABLEAU IX. — Nombre de phages observés et calculés (moyenne de deux expériences).

TEMPS	BACTERIES VIABLES	PHAGES OBSERVÉS	PHAGES CALCULÉS
0 . . . . .	$4,1 \times 10^7$		
30 minutes . . . .	$4,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
1 heure . . . . .	$7,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$
1 h. 30 . . . . .	$8,8 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
2 heures . . . . .	$1,5 \times 10^8$	$8 \times 10^8$	$5,4 \times 10^9$
2 h. 30 . . . . .	$3 \times 10^4$	$9 \times 10^9$	
3 heures . . . . .	$9 \times 10^3$	$1 \times 10^{10}$	

Lyse à 3 h. 45.

encore soixante fois, alors que parmi les phages libres un très petit nombre (au plus égal au nombre de germes viables restant) pourra se multiplier.

Néanmoins, on constate d'après le tableau IX que les chiffres donnés par le calcul sont en bon accord avec l'expérience. Il faut remarquer cependant que l'utilisation dans les calculs des temps moyens de fixation et de multiplication, des taux moyens de multiplication nous ont amenés à supposer en première approximation que les libérations de phages se produisaient en même temps pour toutes les bactéries infectées au même moment. En réalité, il y a des écarts, amenant des décalages qui s'accroissent au cours des réinfections successives. Ceci explique que la libération massive de phages qui s'inscrit à la fin de la portion ascendante de la courbe s'étale sur un certain temps (trente minutes).

Enfin, cette libération est encore suivie d'une légère augmentation tardive du nombre de phages (dans la demi-heure suivante au plus). Cette dernière augmentation, qui peut encore doubler ou tripler le nombre de phages, pourrait provenir de l'infection de quelques bactéries survivantes ou de la dissociation d'agglomérats de phages (dont on connaît l'existence par le microscope électronique).

\*\*

Quoi qu'il en soit, la comparaison des trois courbes montre que la lyse massive se fait une heure à une heure trente après l'infection massive des bactéries correspondantes, alors que la libération des phages est presque terminée trente minutes après cette infection massive.

Il semble donc que la libération des phages par une bactérie infectée précède normalement la lyse de celle-ci. Ce résultat éclaire d'un jour nouveau l'action du thymol sur la bactériophagie. Le thymol inhibe la libération des phages sans inhiber la lyse : il dissocie les deux phénomènes dont l'examen des courbes nous montre l'indépendance relative. La lyse semble due à un système



enzymatique particulier dont l'entrée en action ne serait qu'une conséquence indirecte des modifications de la bactérie produite par le phage dans son cycle de développement.

Nos expériences apportent quelques autres précisions sur les trois temps de la bactériophagie : multiplication, libération des phages, lyse de la bactérie parasitée.

Le thymol tue les germes, mais n'inactive pas les phages libres. On ne peut pas préciser entièrement son action sur les phages fixés. Il est certain que leur multiplication est arrêtée complètement. Cette multiplication, au moment de l'introduction du thymol, est à un stade plus ou moins avancé pour chaque bactérie, et on aurait pu s'attendre à ce que chaque bactérie libère le nombre de phages déjà formés au moment où elle est tuée par le thymol. Le nombre total des phages dans ce cas augmenterait après l'addition de thymol. En réalité, aucune augmentation n'est constatée.

Une question se pose alors : entre le moment de la fixation d'un phage sur une bactérie et celui de la libération des phages nouveaux, le nombre de phages actifs liés à la bactérie croît-il progressivement, ou le processus de formation des nouveaux phages sur une bactérie est-il achevé pour tous en même temps au moment de leur libération ? Dans ce cas, tous acquerreraient à ce moment seulement leur individualité et leur activité.

Les faits observés sont plutôt en faveur de la seconde hypothèse : car si on admettait la première, il faudrait que le thymol, qui est sans action sur les phages libres, soit capable d'inactiver des phages en tout semblables aux phages libres, mais encore fixés sur la bactérie.

Il est vrai que les courbes d'inactivation par les radiations de Luria et Latarjet [3, 4] semblent montrer que les phages néoformés acquièrent assez tôt une certaine individualité ; mais il n'y a aucune raison pour que celle-ci aille de pair avec toutes les propriétés du phage entièrement développé et libre, en particulier avec l'activité spécifique. Les méthodes que nous avons employées ne permettent pas, d'ailleurs, de décider définitivement de ce point.

Mais inversement, si on ne constate pas d'augmentation du nombre des phages, après l'addition de thymol, il n'y a pas non plus de diminution nette de ce nombre. La légère baisse de titre constatée n'est pas significative.

On peut se demander si, au cas où tous les « centres infectieux » constitués par une bactérie ayant fixé un phage étaient totalement inactivés, le titre en phages de la culture ne diminuerait pas nettement après l'addition du thymol et si, par conséquent, chacun de ces « centres » ne libère pas, après l'action du thymol, un seul phage au lieu d'une soixantaine.

De nouvelles expériences, où les proportions respectives de phages libres et fixés seraient déterminées, sont nécessaires pour essayer de répondre à cette question.

Tout se passe comme si la fixation d'un phage sur le germe orientait dans un sens déterminé et dans une succession déterminée deux systèmes enzymatiques de la bactérie, conditionnant le premier la multiplication du phage, le second la lyse de la bactérie. Entre les deux s'interpose le mécanisme de libération des phages.

Le système enzymatique qui produit la lyse de la bactérie intervient seulement quand la multiplication des phages est achevée et un certain temps après la libération de ceux-ci. Il est probablement inhibé pendant le temps de la multiplication du phage et cette inhibition se prolonge quelque temps après.

Le thymol paraît perturber ce mécanisme de deux façons : il bloque le système qui commande la multiplication des phages et il libère, dans un délai raccourci, le système qui commande la lyse.

Les deux systèmes sont donc déclenchés normalement suivant une succession déterminée, mais ils fonctionnent probablement indépendamment l'un de l'autre.

On peut d'ailleurs observer, en dehors de l'intervention du thymol, des lyses bactériophagiques sans multiplication de phages mais dans des circonstances très particulières où un grand nombre de germes se trouvent en présence d'un nombre de phages encore plus grand. Delbruck leur donne le nom de lyses par le dehors, les opposant aux lyses normales qu'il appelle lyses par le dedans.

Nos expériences ne paraissent pas justifier cette interprétation ; il nous semble plutôt que toutes les lyses par le bactériophage sont de même espèce, et qu'elles se produisent sous l'action d'un même système enzymatique, déclenché par un certain état de la bactérie qui peut être consécutif ou non à la multiplication des phages fixés sur elle.

### Conclusions.

1° Le thymol est bactériostatique et bactéricide. Il stérilise à 37° une culture de Y6R contenant au plus  $10^7$  germes par centimètre cube en cinq heures, 98 p. 100 des bactéries étant déjà tuées en une demi-heure. A la glacière, une suspension de bactéries est stérilisée en trois jours.

2° Le thymol n'inactive pas les bactériophages libres, quel que soit le temps de contact. Il y a là un moyen simple pour stériliser une préparation de phages, en particulier pour tuer les bactéries résistantes dans un lysat. Cette méthode remplace avantageusement la filtration, qui diminue toujours le titre.

3° Le thymol n'empêche pas la fixation du phage sur les bactéries.

4° Il arrête la multiplication des phages, sans les inactiver, et n'empêche pas la lyse des germes infectés par le phage. Cette dissociation paraît démontrer l'indépendance de la lyse par rapport à la multiplication du phage. Par ailleurs, l'étude des courbes normales de viabilité, d'opacité et de multiplication des phages est encore un argument en faveur de cette indépendance.

5° Les phages semblent n'acquérir leur individualité complète qu'au moment de leur libération de la bactérie.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] DELBRUCK (M.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 131.
- [2] DELBRUCK (M.). *The Harvey Lectures Series*, 1945, **41**, 161.
- [3] LATARJET (R.). *J. Gen. Phys.*, 1948, **31**, 529.
- [4] LURIA (S. E.) et LATARJET (R.). *J. Bact.*, 1947, **53**, 149.
- [5] WAHL (R.), GRABAR (P.), ROUYER (M.) et BLUM-EMERIQUE (L.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 682.
- [6] WAHL (R.), GRABAR (P.) et BLUM-EMERIQUE (L.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 231.
- [7] WAHL (R.) et BLUM-EMERIQUE (L.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 103.

*Note.* — Pendant l'impression de ce mémoire, nous avons eu connaissance d'une publication de Cohen (S.-S.) [*Bact. Rev.*, 1949, **13**, 1] qui indique l'existence d'une lyse sans multiplication du phage, chez des bactéries dont la respiration est arrêtée par addition au milieu de cyanure, d'iodacétate ou par substitution d'azote à l'oxygène de ce milieu.



## OBSERVATIONS SUR LE POUVOIR ALCOOGENE DES LEVURES CULTIVÉES A BASSE TEMPÉRATURE

par PIERRE BERAUD et JACQUELINE MILLET.

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

Les œnologues ont observé depuis longtemps que les vins étaient plus bouquetés et plus riches en alcool lorsqu'ils provenaient de fermentations conduites à basse température. Des expériences précises ont été faites, à ce sujet, en Italie et en Espagne, il y a une quinzaine d'années. Casale, en Italie [1], a comparé deux vins préparés à partir du même moût, l'un à 20° avec une levure ordinaire, l'autre à 3° avec une levure résistant au froid. Dans le premier cas, la fermentation avait duré huit jours, dans le second un mois, mais le vin provenant de la deuxième opération était plus fin et plus riche en alcool. En Espagne, d'autre part, à la station Villafranca del Panades [2], une perte de 0 d. 65 en alcool a pu être relevée au cours d'une vinification à 30°, la vinification témoin étant conduite à 20°. Plus récemment, M. de Boixo, en France [3], a montré qu'entre 6 et 16°, le degré d'alcool par litre de vin pouvait être obtenu avec 16 g. de sucre au lieu de 17 g. pour les températures voisines de 30°.

La perte d'alcool aux températures élevées est attribuée à l'évaporation et à l'entraînement par le gaz carbonique dont le dégagement est plus intense. Il est permis, cependant, de se demander si l'accroissement de température n'exerce pas, en outre, une action propre sur le fonctionnement de la levure. Delbrück a montré, en effet [4], que le pouvoir ferment de la levure conservée était d'autant plus faible que la température était plus élevée. Se basant sur des observations faites par Büchner et ses collaborateurs à propos de l'influence de la chaleur sur l'activité des préparations zymasiques, il attribuait ce fait à la destruction du complexe zymasique par les diastases protéolytiques de la levure. Berthe Porchet a constaté, par ailleurs [5], que des levures placées à — 2°, au contact de solutions sucrées, produisaient encore de légères quantités d'alcool alors que leur multiplication était complètement arrêtée. Ainsi, nous sommes amenés à penser qu'un froid modéré, ralentissant simplement la prolifération, doit augmenter le pouvoir ferment des cellules prises individuellement.

Pour élucider la question nous avons tenté plusieurs expériences avec 5 *Saccharomyces ellipsoideus* de la collection de l'Institut Pasteur : la levure de distillerie J, 2 levures de champagne : Ay et Verzenay, une levure de Pommard et une levure algérienne (Mrira). Toutes ces levures provenaient, respectivement, d'une cellule unique isolée par la méthode des gouttelettes. Pour les essais, nous les ensemencions dans de l'eau de touraillons glucosée à 15 p. 100 que nous répartissions ensuite dans des tubes à raison de 25 cm<sup>3</sup> par tube. Une série était placée au thermostat à 25°, l'autre au frigidaire à 7°. Tous les tubes étaient munis d'une soupape à acide sulfurique destinée à retenir les vapeurs d'alcool. Pour chaque levure, à des intervalles variables, nous avons dénombré les cellules formées et nous avons dosé par voie chimique l'alcool produit. Dans le tableau I, résumant les résultats obtenus avec la levure Verzenay, figurent, pour chaque détermination, l'alcool en milligrammes présent dans 100 cm<sup>3</sup> et le nombre de globules en millions par centimètre cube de culture. Le quotient du premier de ces chiffres par le deuxième mesure le pouvoir alcoogène moyen de 1 million de cellules.

TABLEAU I.

CULTURES A 25°			CULTURES A 7°		
Millions de cellules par centimètre cube (1)	Milligrammes d'alcool par 100 cm <sup>3</sup> de culture	Pouvoir alcoogène	Millions de cellules par centimètre cube (1)	Milligrammes d'alcool par 100 cm <sup>3</sup> de culture	Pouvoir alcoogène
1,48 (4 h.)	26,5	17,9	2,16 (56 h.)	40,6	18,7
2,40 (6 h.)	29,7	12,3	5,5 (97 h.)	94	17
4,46 (8 h.)	37,1	8,3	8,3 (121 h.)	132	16
15 (13 h.)	119	7,9	17,6 (7 j.)	261	14,8
26,2 (28 h.)	271	10,3	19,2 (10 j.)	487	25,3
34 (22 h.)	373	10,9	21,6 (14 j.)	726	33,6
69 (39 h.)	965	13,9	27 (30 j.)	1.166	43,1
			28,6 (60 j.)	2.303	80,5

(1) Entre parenthèses : l'âge des cultures.

Bien entendu, la comparaison, sous le rapport de ce pouvoir, entre une levure cultivée à 25° et la même levure cultivée à 7°, n'a de sens que si l'on se place à des stades de la culture où, approximativement, le même nombre de globules est présent dans 1 cm<sup>3</sup>.

Les courbes de la figure 1 représentent, pour chacune des levures étudiées, les variations du pouvoir alcoogène, en fonction du nombre des globules, d'une part, pour les cultures à 25°, d'autre part pour les cultures à 7°. On voit que le pouvoir alcoogène est toujours plus élevé à basse température.

Dans les conditions précises où nous nous sommes placés, les résultats précédents n'ont guère d'intérêt au point de vue pratique.

A 7°, en effet, la multiplication des levures normales est trop faible et pour cette raison la fermentation, même après plusieurs mois, reste inachevée malgré le pouvoir alcoogène élevé des cellules formées. Mais il est permis d'escompter un bilan final plus favorable si l'on effectue les essais à des températures intermédiaires ; de 10 à 15° par exemple. A ces températures la fermentation est certes plus lente qu'à 20 ou 25°, mais si nous avons la patience d'attendre, nous pouvons espérer obtenir en fin de compte davantage d'alcool.

L'expérience suivante montre que cette façon de voir est en partie justifiée :

De l'eau de touraillons glucoséeensemencée avec les levures précédentes a été mise en fermentation, d'une part à 15°, d'autre part à 28°. Tous les vases de culture étaient munis de soupapes à acide sulfurique. Il ne peut donc être question, ici, de pertes d'alcool par évaporation. Le tableau II résume les résultats obtenus pour les levures Verzenay et Mrira en fin de fermentation, c'est-à-dire au sixième jour pour les cultures à 28° et au quinzième pour celles à 15°. Les chiffres sont ramenés à 100 cm<sup>3</sup> de culture.

TABLEAU II.

	VERZENAY		MRIRA	
	28°	15°	28°	15°
Sucre initial p. 100 . . . . .	11,120 g.	11,120 g.	12,320 g.	12,320 g.
Sucre restant en fin de fermentation p. 100 . . . . .	0	0	0	0
Sucre consommé p. 100 . . . . .	11,120 g.	11,120 g.	12,320 g.	12,320 g.
Alcool produit p. 100 . . . . .	4,630	5,055 g.	5,440 g.	5,890 g.
Rendement alcool/sucre . . . . .	0,416	0,454	0,441	0,478

On voit que, pour une même quantité de sucre consommé, il y a davantage d'alcool formé dans les cultures maintenues à 15°. Ce résultat n'est cependant pas général. Nous n'avons pu déceler de gain d'alcool à 15° pour la levure Pommard et pour la levure de distillerie J.



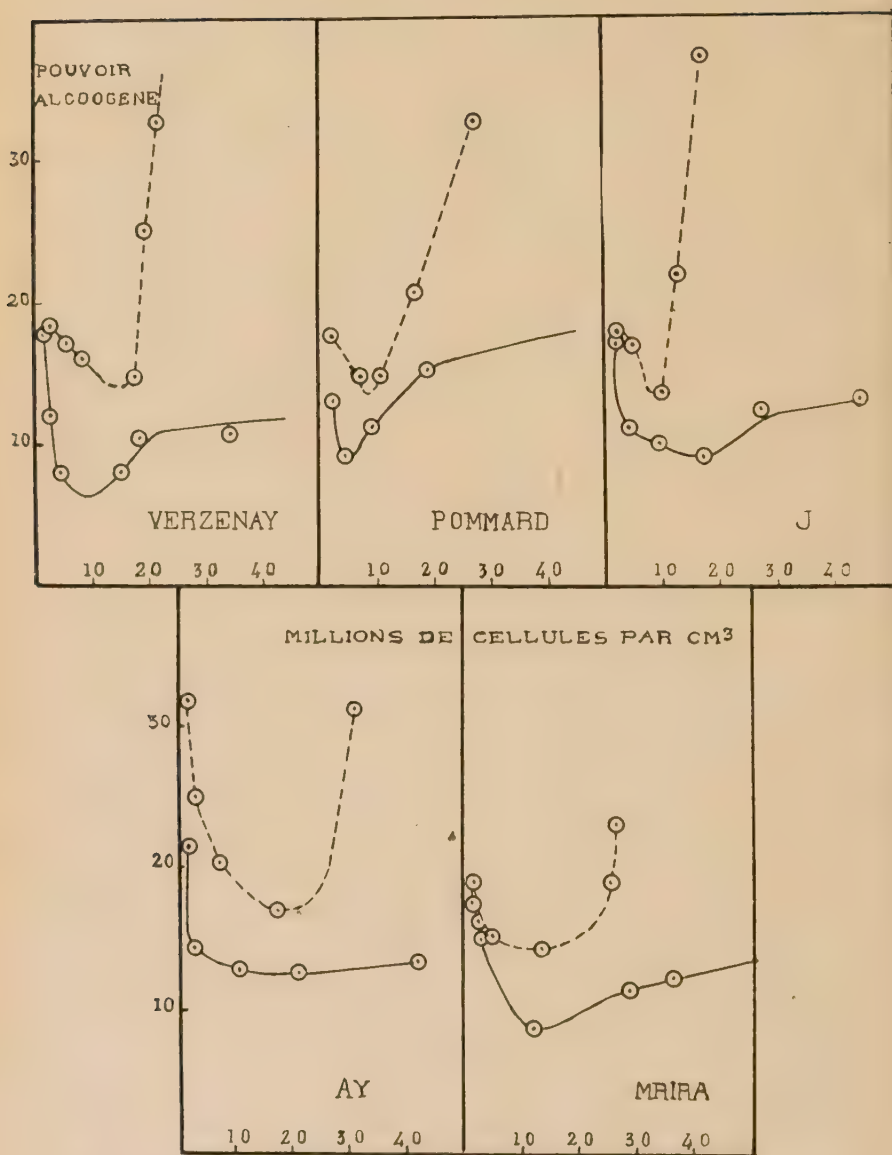


FIG. 1. — Pouvoir alcoogène moyen à différents stades de la culture. Chaque stade est déterminé par le nombre de globules présent dans 1 cm<sup>3</sup>. -----, cultures à 7°; ———, cultures à 25°.

\*  
\* \*

Nous nous sommes demandé s'il ne serait pas possible d'améliorer le travail des levures à 15° en les accoutumant, au préalable, à vivre à une température plus basse. Afin d'étudier ce problème nous avons cultivé pendant huit mois les levures Ay, Verzenay, Pommard, Mrira et J au frigidaire, à la température de 7°. Les repiquages étaient faits en eau de touraillons saccharosée tous les quinze jours environ.

Après 18 passages successifs, les levures ainsi accoutumées au froid ont été comparées aux levures témoins cultivées à l'étuve à 25°. Les essais de comparaison ont été effectués à une température variant entre 13° et 15°. Nous n'avons pu observer, dans ces conditions, de différences sensibles entre levures accoutumées au froid et levures témoins pour les races J et Pommard. Chez les autres races, au contraire, on note pour les levures froides une légère accélération de la fermentation et surtout une meilleure utilisation du sucre.

Voici, par exemple, les résultats obtenus avec la levure de champagne Ay à différents stades de la culture. Les chiffres donnés se rapportent à 100 cm<sup>3</sup> de culture. Nous désignons sous le nom de « rendement » le rapport de l'alcool formé (en poids) au sucre consommé.

Deuxième jour :

	ALCOOL	SUCRE consommé	RENDEMENT
	—	—	—
Levure accoutumée . . . . .	0,970 g.	2,080 g.	0,466
Levure témoin. . . . .	0,943 g.	2,080 g.	0,454

Sixième jour :

	ALCOOL	SUCRE consommé	RENDEMENT
	—	—	—
Levure accoutumée . . . . .	4,14 g.	8,55 g.	0,483
Levure témoin. . . . .	3,94 g.	9,08 g.	0,434

Dixième jour :

	ALCOOL	SUCRE consommé	RENDEMENT
	—	—	—
Levure accoutumée. . . . .	6,20 g.	12,75 g.	0,486
Levure témoin. . . . .	6,18 g.	13,55 g.	0,456

Quatorzième jour :

	ALCOOL	SUCRE consommé	RENDEMENT
	—	—	—
Levure accoutumée . . . . .	6,62 g.	13,78 g.	0,482
Levure témoin. . . . .	6,43 g.	13,78 g.	0,444

Les résultats obtenus pour les races Ay et Mrira sont analogues.

L'augmentation du pouvoir alcoogène chez les levures accoutumées au froid subsiste pendant un certain temps lorsqu'elles sont cultivées de nouveau dans des conditions normales. Le tableau III donne, pour la température de 25°, les pouvoirs alcoogènes des levures témoins et des levures accoutumées au froid après deux passages de ces dernières à 25°.

TABLEAU III. — Pouvoir alcoogène au 2<sup>e</sup> passage à 25°. (1)

		24 HEURES	48 HEURES	72 HEURES	5 JOURS
Verzenay.	Témoin . .	$\frac{952}{122} = 7,8$	$\frac{2\ 345}{257} = 11,4$	$\frac{3\ 572}{68} = 13,3$	$\frac{4\ 420}{317} = 13,9$
	Froide. . .	$\frac{4\ 207}{145} = 10,5$	$\frac{2\ 748}{231} = 11,9$	$\frac{3\ 748}{255} = 14,7$	$\frac{4\ 435}{319} = 13,9$
Pommard.	Témoin . .	$\frac{910}{111} = 8,2$	$\frac{2\ 357}{185} = 12,7$	$\frac{3\ 220}{236} = 13,6$	$\frac{4\ 613}{329} = 14$
	Froide. . .	$\frac{4\ 173}{97} = 12,1$	$\frac{2\ 335}{168} = 13,9$	$\frac{3\ 197}{230} = 13,9$	$\frac{4\ 598}{291} = 15,8$
J.	Témoin . .	$\frac{1\ 084}{172} = 6,3$	$\frac{2\ 680}{262} = 10,2$	$\frac{3\ 874}{319} = 11,8$	$\frac{4\ 785}{359} = 13,3$
	Froide. . .	$\frac{945}{175} = 5,4$	$\frac{2\ 792}{297} = 9,4$	$\frac{4\ 043}{311} = 13$	$\frac{4\ 522}{323} = 14$
Ay.	Témoin . .	$\frac{870}{124} = 7$	$\frac{2\ 216}{240} = 9,2$	$\frac{3\ 550}{300} = 11,8$	$\frac{4\ 064}{286} = 14,2$
	Froide. . .	$\frac{4\ 108}{132} = 8,4$	$\frac{2\ 468}{242} = 10,2$	$\frac{3\ 641}{296} = 12,3$	$\frac{4\ 915}{247} = 19,9$
Mrira.	Témoin . .	$\frac{992}{122} = 8,1$	$\frac{2\ 531}{207} = 12,2$	$\frac{3\ 962}{272} = 14,5$	$\frac{4\ 667}{298} = 15,6$
	Froide. . .	$\frac{4\ 253}{109} = 11,5$	$\frac{2\ 500}{188} = 13,3$	$\frac{3\ 963}{298} = 13,3$	$\frac{4\ 247}{287} = 14,8$

(1). Quotient de l'alcool (en milligrammes) présent dans 100 cm<sup>3</sup> par le poids sec (en milligrammes) de la levure formée dans 100 cm<sup>3</sup> de culture.

On remarquera, toutefois, le comportement particulier des races J et Mrira qui, pendant une partie de leur développement, présentent pour les levures froides un abaissement du pouvoir alcoogène moyen.



La différence entre levures normales et levures froides s'atténue avec le nombre des passages. Cependant, au cinquième passage, le phénomène subsistait encore pour les levures Verzenay, Pommard et Ay. Il était même encore très net pour la levure Ay au dixième passage à 25°.

Il s'agit là, probablement, d'un de ces cas de variations plus ou moins passagères mis autrefois en évidence par Hansen et dont nous possédons aujourd'hui de nombreux exemples.

Nous n'avons pas fait l'étude génétique des cinq races utilisées au cours de notre travail. Dans les présentes expériences, nous sommes partis de cellules uniques, mais il est possible que les races étudiées soient génétiquement impures. En ce qui concerne la persistance relative d'un pouvoir alcoogène plus élevé, chez les levures froides cultivées de nouveau à température normale, l'hypothèse d'une sélection partielle par le froid ne peut donc être exclue.

#### RÉSUMÉ.

Cultivées à basse température (7°), les levures se multiplient moins activement mais produisent davantage d'alcool.

À des températures voisines de 15°, la multiplication n'étant que peu freinée et le pouvoir alcoogène restant élevé, le rendement final en alcool est, pour plusieurs levures, plus élevé qu'à 25°. L'amélioration de rendement observée pour les vinifications à basse température est donc due non seulement à la réduction des pertes d'alcool par évaporation et entraînement par le gaz carbonique, mais encore à l'augmentation du pouvoir alcoogène des levures.

L'accoutumance au froid a donné un résultat satisfaisant pour trois levures sur les cinq étudiées. Elle se traduit par une légère accélération de la fermentation et par une meilleure utilisation du sucre.

L'augmentation du pouvoir alcoogène chez les levures accoutumées au froid se maintient même après plusieurs repiquages lorsqu'elles sont cultivées de nouveau dans des conditions normales puis finit par disparaître.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] CASALE. *Trabajos del IXº Congreso internacional de Química pura y aplicada* (Madrid), 1934.
- [2] CAMPLONCH. *Agricultura* (Madrid), 1931, 35.
- [3] M. DE BOIXO. *C. R. Acad. d'Agriculture de France*, 1948, 34, 281.
- [4] DELBRÜCK. *Ann. de Brasserie et de Distillerie*, 1902, 5, 49.
- [5] BERTHE PORCHET. *Ann. Ferment.*, 1938, 4 578.

# DEVENIR DES CÉNAPSES LIPOPROTÉIQUES AU COURS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PROTÉINES DU SÉRUM SANGUIN

par J. BLASS, M. MACHEBOEUF, P. SPRINGELL et F. TAYEAU.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique.)

L'un de nous [1] a récemment constaté que l'hydrolyse par la trypsine, même lorsqu'elle est poursuivie relativement loin, laisse en solution aqueuse certains des lipides du sérum. Nous avons repris ce travail en poussant plus loin l'analyse du phénomène.

## CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Du sérum de cheval recueilli aseptiquement et vieux tout au plus de deux jours est chauffé pendant quinze minutes à 45° C afin d'inactiver l'antitrypsine. On ajoute alors, pour 1 litre, 50 ml. d'une solution à 10 p. 100 de nitrate de calcium et 50 ml. d'une solution de cyanure de potassium à 7,5 p. 100 (effecteurs enzymatique et antiseptique). On ajuste le pH au voisinage de 8 par une quarantaine de gouttes de NaOH N/5. Puis on ajoute 20 grammes de poudre d'une très bonne trypsine commerciale (British Drug House) que nous avons préalablement traitée par des épuisements au moyen d'alcool absolu et d'éther à basse température (temp. < -5° C) afin d'enlever les petites quantités de lipides qu'elle contenait comme impuretés (1). On complétait le volume exactement à 1.500 ml., puis on plaçait dans un thermostat à 37° C. L'hydrolyse des protéines était surveillée chaque jour par un titrage selon Sørensen, pratiqué sur un échantillon de 1 ml. de liquide (clarifié par centrifugation). L'hydrolyse atteignait sa limite vers le neuvième jour. Le titrage donnait alors 7,56 g. d'azote aminé par litre de sérum (dont 1 g. est à l'état de NH<sub>3</sub>, méthode de dosage de Raynaud et Gros [2]). Mais un échantillon témoin de sérum sans trypsine donne alors

(1) Certaines préparations commerciales de trypsine contiennent des lipides en abondance (jusqu'à 17 p. 100). Les épuisements par l'alcool et l'éther à froid les enlèvent bien sans modifier l'activité protéolytique de l'enzyme.

0,6 et, d'autre part, un autre témoin constitué par la même quantité de trypsine, conservé dans de l'eau au même pH, à la même température, en présence des mêmes quantités de nitrate et de cyanure, donne 0,76. La quantité d'azote aminé libérée par l'hydrolyse trypsique du sérum est donc 5,2 g. par litre de sérum. Sachant que l'hydrolyse trypsique laisse intacts certains polypeptides, nous pouvons conclure que l'hydrolyse trypsique fut bien effectuée.

Pour vérifier, nous avons dosé : 1° L'azote précipitable par l'acide trichloracétique : 2,4 g. par litre et, 2° l'azote précipitable par l'acide phosphotungstique en présence d'acide sulfurique N/5 : 5,0 g. par litre (témoins déduits). Le sérum témoin sans trypsine contenait 11,25 g. par litre d'azote précipitable par l'acide phosphotungstique et cet azote était entièrement précipitable par l'acide trichloracétique.

En somme, l'hydrolyse trypsique dans les conditions où nous nous sommes placés a bien touché très profondément les protéines du sérum ; elle n'en a laissé qu'un cinquième environ sous forme précipitable par l'acide trichloracétique. En essayant de prolonger plus longtemps l'hydrolyse, les résultats restèrent pratiquement les mêmes.

Le mélange, à la fin de l'hydrolyse, contient un précipité assez abondant (le témoin « trypsine sans sérum » en contient à peu près autant, car notre trypsine n'était pas entièrement soluble). Ce précipité fut séparé par centrifugation et analysé. On y rechercha les lipides : 1° le précipité fut agité avec de l'éther qui a dissous d'assez abondantes substances : 0,6 g. par litre de sérum ; 2° le précipité déjà traité par l'éther fut épuisé par de l'alcool bouillant, puis par de l'éther (dans un appareil de Kumagawa). On obtint ainsi encore 1,4 g. par litre de sérum.

Les témoins « trypsine sans sérum » et « sérum sans trypsine » donnaient tous des résultats pratiquement nuls dans ces conditions. On peut donc affirmer que l'analyse trypsique a fait précipiter des lipides. Mais une partie seulement de ces lipides est directement soluble dans l'éther, tandis que plus des 2/3 ne peuvent être extraits du précipité que par des épuisements à chaud au moyen d'alcool, puis d'éther. Une grande partie des lipides précipités doit donc encore être liée à des protéines ou à des produits d'hydrolyse partielle de protéines. L'hydrolyse trypsique ne libère qu'une très faible proportion des lipides totaux du sérum, car l'éther agité avec le sérum hydrolysé et avec le précipité correspondant ne dissout au total que 0,66 g. de lipides pour 1 litre de sérum qui contenait 4,1 g. de lipides totaux. L'hydrolyse trypsique libère donc tout au plus un septième des lipides du sérum. Notons en outre qu'une hydrolyse de certains lipides évolue sûrement dans les conditions où nous nous



sommes placés, car, parmi les lipides retrouvés dans le précipité que n'avait pas dissous l'éther, on trouve de petites quantités de savons dont les acides gras passent dans l'éther si l'on acidifie (0,3 g. par litre environ) et l'on en trouve aussi dans le liquide surnageant (0,7 g. par litre). La quantité de savons ainsi formée est en tout cas inférieure à ce qu'il faudrait pour expliquer la proportion des lipides qui restent en solution dans le liquide aqueux après l'hydrolyse trypsique (2 g. par litre). Ce problème fut étudié séparément sur le même sérum : avant l'hydrolyse, la quantité totale de savons fut, tout au plus, égale à 0,2 g. par litre. Après l'hydrolyse, les savons étaient nettement plus abondants : environ 1,0 g. (somme des savons du précipité et de la solution).

Or, les lipides totaux dans ce sérum représentaient 4,1 g. La proportion hydrolysée à l'état d'acides gras est donc faible. A quel état sont les lipides qui restent en solution dans l'eau lorsque l'hydrolyse trypsique a évolué jusqu'à sa limite ? C'est ce problème qui fut le principal objet de nos recherches.

Le liquide provenant de l'hydrolyse trypsique, débarrassé du précipité fut additionné de sulfate d'ammonium en poudre jusqu'à saturation à la température ordinaire. Ceci fit apparaître un précipité assez peu abondant qui fut recueilli, puis épuisé par de l'alcool bouillant et par de l'éther pour en extraire les lipides. On trouva 1,3 g. par litre (y compris 0,15 d'acides gras à l'état de savons). Dans le sérum témoin non soumis à l'action de la trypsine, le sulfate d'ammonium précipite dans ces conditions 4,2 g. de lipides par litre. La différence est considérable. Si l'on se rappelle que le précipité obtenu pendant la digestion trypsique contenait 2 g. de lipides, il doit rester des lipides dans la solution aqueuse, saturée en sulfate d'ammonium. Ce liquide fut concentré par distillation sous vide en évitant soigneusement toute élévation de la température au delà de 45° C. On obtint ainsi une pâte cristalline de sulfate d'ammonium qui fut épuisée par de l'alcool bouillant, puis par de l'éther chaud (2). Les solutions alcooliques et éthérées furent évaporées sous vide et le résidu fut desséché dans un dessiccateur à vide en présence d'anhydride phosphorique. Le résidu sec fut repris : 1° par du chloroforme, et la solution chloroformique fut filtrée, puis évaporée, son résidu fut pesé : 2° par de l'éther en présence d'eau acidulée, qui dissolvait encore quelques acides gras de savons que le chloroforme n'avait pas dissous.

(2) Pour éviter tout apport de lipides étrangers au sérum, le sulfate d'ammonium était convenablement purifié et tous les appareils ainsi que les cartouches en carton des extracteurs Kumagawa étaient soigneusement délipidés, avant usage, par des lavages au moyen d'alcool bouillant puis d'éther.

Dans le sérum étudié ici, la masse des substances solubles dans le chloroforme ainsi retrouvée dans la solution aqueuse saturée en sulfate d'ammonium fut 0,47 g. par litre de sérum. Chiffre assez faible, mais correspondant cependant à 11,2 p. 100 des lipides totaux du sérum, ce qui est très notable. Le même sérum, sans action de la trypsine, traité dans les mêmes conditions, ne donnait que 0,14 g. par litre.

Notons que l'un de nous (Tayeau [3]) avait cru que la quantité de lipides restant dans l'eau après analyse tryptique et après précipitation par le sulfate d'ammonium était plus élevée, mais ses chiffres étaient simplement obtenus par différence, en négligeant les lipides précipités pendant l'hydrolyse tryptique. Dans le présent travail, nous avons, au contraire, étudié directement les lipides restés en solution, en les extrayant malgré les difficultés occasionnées par les quantités importantes d'eau et de sels avec lesquels ils se trouvaient.

Notons dès maintenant que l'extrait chloroformique ainsi pesé n'est pas constitué seulement par des lipides. Des substances non lipidiques et très riches en azote passent également en solution dans le chloroforme. Il est facile de les éliminer en reprenant le mélange par un peu d'éther et un peu d'eau. On agite avec ces deux phases liquides non miscibles, puis on laisse décanter. L'eau retient les substances azotées et l'éther s'empare des lipides dont le poids est seulement de 0,090. Il s'agit bien alors de lipides vrais, car leur teneur en acides gras déterminée après saponification est normale.

En plus de ces lipides qu'avait dissous le chloroforme, on retrouve de petites quantités de savons en reprenant par de l'eau acidulée et de l'éther la partie insoluble dans le chloroforme (0,07 g. de savons par litre de sérum).

*En somme*, l'hydrolyse tryptique des protéines du sérum, dans les conditions où nous avons opéré, donne pour les lipides des résultats très compliqués :

1° Des lipides précipitent et deviennent directement extractibles par l'éther. Ces lipides représentent seulement 14,6 p. 100 des lipides totaux, soit 0,6 g. par litre.

2° Des lipides précipitent, mais ne sont pas directement solubles dans l'éther ou le chloroforme. (Pour rendre ces lipides solubles dans l'éther, il faut dénaturer les protéines du précipité par de l'alcool bouillant) 1,1 g. par litre (26 p. 100).

3° De petites quantités de savons précipitent également 0,3 g. par litre (8 p. 100).

4° Des savons restent en solution : 0,72 g. par litre, soit 17 p. 100.

5° Des lipides restent en solution, mais précipitent avec des protides lorsque l'on sature en sulfate d'ammonium : 1,3 g. par

litre, soit 31,7 p. 100 (y compris de très minimes quantités de savons).

6° Des lipides restent en solution aqueuse même après saturation du liquide par du sulfate d'ammonium.

a) Parmi ces lipides, une infime proportion seulement, 0,03 g. par litre (soit 0,7 p. 100 de lipides totaux du sérum) passe dans l'éther si l'on agite la solution avec ce solvant.

b) Tout le reste des lipides reste dans la phase aqueuse saturée en sulfate d'ammonium et ne passe pas dans l'éther : 0,09 g. par litre, soit 2,1 p. 100 des lipides totaux du sérum.

La solubilité si anormale de ces substances dans l'eau n'est pas explicable par l'existence d'une proportion élevée de savons, car on ne retrouve dans ces lipides qu'un tiers environ de savons.

Ces lipides sont d'ailleurs très particuliers. Ils sont parfaitement solubles dans le chloroforme, mais ne se dissolvent pas dans l'éther de pétrole.

Il ne s'agit pas d'un dérivé de cholestérol, car le dosage du cholestérol par la méthode de Machebœuf et Delsal [4] ne révèle qu'une proportion infime de ce corps : 0,5 p. 100.

Il ne s'agit pas non plus d'acides phosphatidiques ou de phosphoaminolipides, car la recherche du phosphore est rigoureusement négative. Le cholestérol, les stérides et les phospholipides se retrouvent donc entièrement dans les autres fractions et ce sont des substances lipoidiques très particulières qui restent ainsi en solution aqueuse après l'hydrolyse trypsique et après précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation.

Rappelons que la fraction lipidique si curieuse que nous obtenons ainsi à partir de la solution aqueuse saturée en sulfate d'ammonium est accompagnée dans l'extrait chloroformique brut par d'abondantes substances non lipidiques.

Pour le sérum correspondant à l'expérience décrite ci-dessus notre extrait chloroformique brut donnait seulement par hydrolyse 11 p. 100 d'acides gras ; la masse des substances qui passèrent dans l'éther lors de la reprise par l'éther et l'eau correspondait à 16 p. 100 de l'ensemble, tandis que l'eau s'emparait de 84 p. 100. Nous pouvons donc conclure que notre extrait chloroformique était en majeure partie constitué par des substances hydrosolubles non lipidiques azotées, mais que les acides gras étaient à l'état de lipides typiques parfaitement solubles dans l'éther en présence d'eau.

Une question se pose ici : quelles sont les substances azotées qui accompagnent les lipides dans le chloroforme ? Notons d'abord que l'azote n'est pas simplement ammoniacal, car un dosage de  $\text{NH}_3$  effectué selon la technique de Raynaud et Gros [2] montre que la proportion d'azote sous forme ammoniacale est tout au plus de un huitième de l'azote total. Le reste de l'azote

n'est cependant pas précipitable par l'acide phosphotungstique en présence d'acide sulfurique N/5 (précipité infime négligeable dans l'hydrolysât chlorhydrique de notre fraction). D'autre part, l'azote n'appartient ni à un peptide, ni à un  $\alpha$  aminoacide connu, car la réaction à la minhydrine (directement ou après hydrolyse) est entièrement négative dans les conditions où elle donne une intense teinte bleu-violet avec des solutions d'aminoacides dont la teneur en azote est identique. La chromatographie de partage selon Consden, Gordon et Martin [5] ne donne d'ailleurs pas la moindre tache pouvant correspondre à un aminoacide. L'azote n'appartient pas non plus à une osamine, car la recherche des oses et des osamines dans les produits d'hydrolyse fut négative. Nous ne disposons pas de masses suffisantes de matière pour pouvoir poursuivre plus loin l'étude de ces impuretés azotées qui passent avec nos lipides dans le chloroforme et que l'on en sépare par partage entre l'eau et l'éther. Ce problème est d'ailleurs très secondaire pour ce qui nous intéresse ici. Concluons donc simplement ainsi :

Lorsqu'on soumet un sérum à l'hydrolyse trypsique, puis que l'on précipite par le sulfate d'ammonium à saturation les quelques protéines qui ont résisté à l'hydrolyse, il reste en solution aqueuse salée quelques lipides que l'éther ne peut pas extraire directement de la phase aqueuse. Pour déceler ces lipides, il faut évaporer la solution aqueuse et traiter le résidu par de l'alcool chaud, puis évaporer les solutions alcooliques et reprendre leur résidu par du chloroforme. Mais ce solvant ne dissout pas que des lipides ; il entraîne avec eux des substances azotées qui ne sont pas des sels ammoniacaux ni des aminoacides, ni des peptides, ni des glucides azotés. On peut éliminer facilement ces impuretés azotées par partage entre de l'éther et de l'eau. L'éther dissout alors très bien les lipides qu'il ne dissolvait pas avant le traitement par l'alcool chaud. Les lipides finalement obtenus ont bien un aspect typique et ils donnent bien en abondance des acides gras lorsqu'on les hydrolyse ; mais ils ne contiennent ni cholestérol, ni phospholipides.

Or, l'agitation avec de l'éther de la phase aqueuse saturée de sulfate d'ammonium n'avait pas fait passer ces lipides dans l'eau. Il faut donc admettre que les traitements par l'alcool qui nous ont permis d'extraire la fraction de sa solution aqueuse sulfatée ont transformé ces lipides en les rendant éthérosolubles et insolubles dans l'eau. Après ces traitements, les lipides ont des caractères de solubilité normaux qu'ils n'avaient pas auparavant. Lorsque l'on extrait les lipides du sérum par des épuisements au moyen d'alcool dans un appareil de Kumagawa, on doit de même libérer les lipides qui nous intéressent des attaches avec d'autres substances qui les maintenaient à l'état dissous en phase aqueuse.



Ces résultats préliminaires sont à rapprocher de faits découverts récemment (Blass, Machebœuf et Springell [4]) : le sérum de cheval normal, sans intervention de la trypsine, contient, lui aussi, de petites quantités de substances lipoidiques qui ne précipitent pas avec les protéines lorsque l'on sature le sérum par du sulfate d'ammonium. Dans le sérum qui nous servit pour les essais rapportés aujourd'hui, nous en avons retrouvé 35 mg. par litre, tandis qu'après hydrolyse tryptique, nous en trouvons 90 mg. Peut-être le fait d'avoir détruit par hydrolyse la majeure partie des protéines évite l'entraînement dans le précipité par le sulfate d'une partie des substances qui nous intéressent. Dans ce cas, la quantité de ces curieuses substances lipoidiques hydrosolubles serait donc plus grande encore que le fait apparaitre l'étude du sérum non soumis à l'action de la trypsine.

Tout ce que nous venons de dire fut vérifié sur trois autres sérums de chevaux avec des résultats concordants. Nous nous contentons donc de donner ci-contre les résultats analytiques pour un seul sérum.

Notons enfin que les chiffres du tableau furent tous obtenus en pesant simplement les extraits chloroformiques. Or, un travail très récent de notre laboratoire (Berger [6]) prouve que ce solvant ne dissout pas uniquement les lipides et qu'il conduit, par conséquent, à des erreurs par excès non négligeables. Ceci ne trouble en tout cas pas nos dosages de savons ni les dosages de cholestérol que nous avons effectués sur toutes les fractions.

D'autre part, ce même travail de Berger prouve que l'extraction des lipides par l'alcool bouillant et l'éther chaud est bien quantitatif pour le sérum initial, mais ne l'est plus tout à fait pour les sérums soumis à certaines manipulations telles que le fractionnement par les sels et la dialyse. Ceci explique, par exemple, que le sérum initial nous ait fourni un extrait lipoidique de 5,7 g. par litre, alors que la somme des diverses fractions chloroformiques obtenues est seulement 4,1. Le simple vieillissement du sérum à l'étuve à 37° C dans nos essais témoins conduit exactement au même résultat, 4,2 g. par litre. Le sérum, en vieillissant, voit certains de ses lipides devenir inextractibles et rester dans les coagulums protéiques malgré les épuisements par l'alcool chaud et l'éther. Nous avons tenu compte de cette erreur systématique en calculant pour chaque fraction le pourcentage par rapport aux lipides retrouvés dans le témoin après vieillissement (le simple vieillissement et l'hydrolyse tryptique sont deux phénomènes très différents, mais ils conduisent à une perte identique de lipides lorsqu'on utilise pour le dosage l'extraction par l'alcool chaud et l'éther chaud).

Notons que, dans nos essais, nous avons utilisé une préparation

industrielle de trypsine, et non de la trypsine cristallisée hautement purifiée. Nous avons donc, dans nos solutions, quelques autres enzymes à l'état d'impuretés. C'est peut-être à ce fait que nous devons la disparition d'une proportion assez notable des phospholipides pendant l'hydrolyse trypsique. Exemple : le sérum témoin conservé simplement à 37° C en présence de cyanure et de nitrate, mais sans trypsine, donnait à l'analyse 75 mg. de phosphore lipidique par litre, tandis que le même sérum, après protéolyse, n'en contenait plus que 30 mg. La différence est très notable (le même sérum, frais, donnait 80 mg. par litre, donc le séjour du témoin à l'étuve n'avait pas modifié profondément les phospholipides. La lécithinase du sérum était très peu active dans les conditions de nos expériences, mais une lécithinase un peu plus active existait dans la trypsine commerciale utilisée).

Dans le tableau ci-contre, les résultats sont exprimés en grammes par litre de sérum. Les chiffres ne correspondent

**Extraits chloroformiques en grammes par litre du sérum N° IX.**

	SÉRUM FRAIS	SÉRUM FRAIS conservé sans trypsine	SÉRUM protéolysé
Extrait total selon Shimidzu-Kumagawa . . . . .	5,7	4,2	4,1
Savons contenus dans cet extrait . . .	0,2	0,4	1,0
Précipité pendant la protéolyse ou pendant le vieillissement du témoin à 37° . . . . .	0	0,05	2,0
Savons contenus dans le précipité . .	0	0	0,3
Substances directement extractibles par agitation avec éther . . . . .	0,015		0,66
En solution mais précipitant par le sulfate d'ammonium à saturation .	5,3		1,3
Resté en solution malgré saturation par sulfate d'ammonium . . . . .	0,14		0,47
Contrôle : ensemble acide gras + insaponifiable retrouvé après hydrolyse alcaline des protéines . . . . .	3,6		3,6
Cholestérol total . . . . .	1,15		1,06
Cholestérol extractible directement par éther . . . . .	Moins de 0,01		0,20
Cholestérol restant en solution après précipitation par sulfate d'ammonium.	0,001		0,002

pas rigoureusement à des lipides, mais simplement à ce que le chloroforme dissolvait. Or, on sait que ce solvant dissout quelques impuretés non lipidiques [6]. Ceci est surtout important pour la fraction des lipides restée en solution après saturation par le sulfate d'ammonium. Dans ce cas, en effet, pour le sérum soumis à la protéolyse, le chiffre indiqué dans le tableau est 0,47,

or les lipides vrais représentent seulement 0,090. La différence est due à des substances azotées non lipidiques solubles dans le chloroforme (voir texte ci-dessus page 591). Dans toutes les autres fractions, l'erreur due aux substances non lipidiques dissoutes par le chloroforme est faible, car l'analyse des fractions donne toujours de 50 à 66 p. 100 d'acides gras et de 16 à 30 p. 100 de cholestérol.

#### RÉSUMÉ.

La protéolyse trypsique du sérum (par une trypsine commerciale) modifie l'état des lipides du sérum sanguin. Une partie des lipides précipite avec quelques protéines. Mais une autre partie reste en solution. Si l'on sature le liquide par du sulfate d'ammonium, on précipite quelques protéines qui ont résisté à l'hydrolyse. Ces protéines sont accompagnées par quelques lipides. Mais il reste encore des lipides en solution aqueuse bien que la proportion de protéines encore présentes soit infime. Ces lipides hydro-solubles indépendants des protéines sont peu abondants, mais non négligeables (90 mg. environ par litre de sérum). Ce ne sont pas des savons. L'agitation avec de l'éther de la solution aqueuse salée ne permet pas d'extraire ces lipides dont la stabilité en phase aqueuse est remarquable. Pour déceler ces lipides, il faut évaporer la solution aqueuse et épuiser le résidu par de l'alcool bouillant. Les lipides ainsi obtenus sont alors parfaitement solubles dans l'éther, même en présence d'une phase aqueuse. On doit donc conclure qu'il existe dans les produits d'hydrolyse trypsique du sérum de petites quantités de lipides solubles dans l'eau, même en présence de sulfate d'ammonium saturé et d'éther, alors que la solution ne contient pas de protéines vraies en quantités relativement notables.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLASS (Y.), SPRINGELL (P.) et MACHEBOEUF (M.). Ces *Annales*, 1948, **75**, 442.
- [2] RAYNAUD (M.) et GROS (F.). Ces *Annales*, 1947, **73**, 1003.
- [3] TAYEAU et BRETON. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 680.
- [4] MACHEBOEUF (M.) et DELSAL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 116.
- [5] CONSDEN, GORDON et MARTIN. *Biochem. J.*, 1944, **38**, 224.
- [6] M<sup>lle</sup> BERGER. Travail présenté pour le diplôme d'Etudes supérieures. Paris 1949. Inédit.

**ÉTUDE DU MODE DE MULTIPLICATION  
DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE  
(*MYCOBACTERIUM AVIUM*)  
DANS LE MILIEU DE CULTURE DE DUBOS**

(DEUXIÈME PARTIE)

**COURBES DE CROISSANCE**

par M<sup>me</sup> S. IMELIK et J. BRETEY (\*).

(*Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la Tuberculose.*)

Les nouveaux milieux mis au point par Dubos [1], en particulier celui contenant l'agent mouillant « Tween 80 », permettent aux Mycobactéries de pousser sous une forme plus ou moins homogène. Cette forme de croissance nous donne la possibilité d'appliquer, mais avec certaines réserves, les méthodes bactériologiques classiques à l'étude de la croissance des bacilles tuberculeux. Nous apportons ici les observations que nous avons faites avec le bacille aviaire.

La souche utilisée est le bacille aviaire Nr. 80, virulente pour la poule et le lapin, de la collection du laboratoire de la tuberculose à l'Institut Pasteur.

L'ensemencement des tubes d'expérience était pratiqué à partir de la culture sur milieu à l'œuf (Löwenstein), âgée de quinze jours.

Nous avons étudié le développement des bacilles aviaires en fonction :

A. De la masse totale bactérienne mesurée par la méthode néphélométrique.

B. Du nombre total des germes présents.

A. — La méthode néphélométrique est très souvent préférée aux autres méthodes pour suivre l'évolution de la croissance d'une culture à cause de sa facilité et parce qu'elle comporte moins d'erreurs que la numération directe (pour la discussion voir Monod [2]).

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 mai 1949.



Quoique la méthode néphélométrique puisse remplacer dans beaucoup de cas la numération directe, il y a lieu de ne l'appliquer qu'avec une certaine réserve. Nous savons que la néphélométrie donne la densité optique d'un milieu, densité qui est fonction du nombre et de la taille des particules en suspension. Aussi, pour que la méthode soit applicable à la détermination du nombre des microbes, faut-il que la taille de ceux-ci reste constante pendant la durée d'expérience. Cette condition est remplie pour la plupart des micro-organismes à croissance et à multiplication rapides, bien que les expériences de Hershey [3] faites avec *Escherichia coli* aient révélé des différences appréciables dans certaines conditions. Mais l'importance de cet écart peut être beaucoup plus sensible avec des bactéries ayant une croissance assez lente. C'est le cas, en particulier, pour les Mycobactéries. En outre, nous avons montré dans un travail précédent que la taille de celles-ci ainsi que la constitution des agglomérats bacillaires qui se forment dans le milieu de Dubos pendant la croissance subissent d'importantes variations. Nous allons voir, en effet, plus bas, que les courbes de densité optique ne permettent pas d'évaluer avec une bonne approximation le nombre des microbes. Pourtant, les courbes néphélométriques seront très utiles pour mettre en évidence certains caractères de la croissance du bacille aviaire.

Nous avons fait nos mesures avec un appareil de Meunier, en employant la cuvette de 10 mm. d'épaisseur et l'écran 74.

**B. — NUMÉRATION DES GERMES.** — Il existe différentes façons d'apprécier le nombre des germes contenus dans des suspensions. Les méthodes les plus couramment employées se ramènent à deux principales :

- a) Numération des bacilles vivants par numération des cultures :
- b) Numération directe à la cellule de tous les éléments, qu'ils soient vivants ou morts.

La première de ces méthodes n'est pas toujours suffisante pour l'étude de la croissance des cultures bactériennes. Néanmoins, son emploi donne des approximations satisfaisantes, à condition que la suspension bactérienne soit homogène et que les milieux de culture soient excellents, facteurs indispensables pour obtenir la multiplication des germes individuellement. Nous avons utilisé des milieux de Löwenstein fraîchement préparés.

Dans un travail précédent, nous avons constaté que la croissance du bacille aviaire dans le milieu de Dubos s'effectue suivant un mode particulier, *en amas*, qui ne permet pas d'obtenir des cultures bacillaires en suspension réellement homogènes. Nos observations ont montré que, en période de croissance, la plupart des bacilles sont groupés en amas d'inégale grandeur, contenant des nombres très variés de germes qui ne sont pas, du reste, au

même stade de croissance, nombre d'ailleurs plus élevé en période de multiplication active et au contraire nettement réduit pendant la phase que nous avons appelée de maturation.

Pour cette raison, la numération des germes vivants uniquement par culture sur milieux solides ne peut pas servir pour l'évaluation précise de l'accroissement du bacille aviaire. Mais, la numération des amas permet cependant d'évaluer le nombre total de germes.

NUMÉRATION PAR CULTURE. — 1° La méthode de Mc Grady nous a servi à déterminer le nombre des amas (1) bactériens. Les suspensions sont faites directement à partir de la culture après agitation des tubes. Les ensemencements ont été faits à partir de dilutions progressives sur milieu de Löwenstein en employant 4 tubes pour chaque dilution. La numération et le calcul du nombre probable de germes ont été faits selon la technique habituelle, et avec les tables connues.

2° La détermination de répartition des germes dans les amas a été effectuée en étalant en couche aussi mince que possible 1 goutte

TABLEAU I.

TEMPS en heures	NOMBRE d'amas dans la suspension	RÉPARTITION DES GERMES dans les amas (numération directe)	NOMBRE total de germes calculé
<i>Ensemencement : <math>10^{-3}</math> mg. par tube :</i>			
24 . . .	$2 \times 10^7$	1 — 98 p. 100; 2 — 2 p. 100.	$2 \times 10^7$
48 . . .	$3,5 \times 10^7$	1 — 1 p. 100; 2 — 2 p. 100; 4 — 97 p. 100.	$1,4 \times 10^8$
72 . . .	$2,5 \times 10^8$	1 — 1 p. 100; 2 — 2 p. 100; 4 — 20 p. 100; 8 — 77 p. 100.	$1,7 \times 10^9$
96 . . .	$6 \times 10^8$	1 — 4 p. 100; 2 — 16 p. 100; 4 — 40 p. 100; 8 — 40 p. 100.	$3,1 \times 10^9$
120 . . .	$2,5 \times 10^9$	1 — 25 p. 100; 2 — 70 p. 100; 4 — 5 p. 100.	$4,6 \times 10^9$
196 . . .	$6 \times 10^9$	1 — 90 p. 100; 2 — 10 p. 100.	$6,6 \times 10^9$
<i>Ensemencement : <math>10^{-7}</math> mg. par tube :</i>			
144 . . .	$6 \times 10^6$	2 — 12 p. 100; 4 — 88 p. 100.	$2,3 \times 10^7$
168 . . .	$3,5 \times 10^7$	2 — 2 p. 100; 4 — 4 p. 100; 8 — 38 p. 100; 16 — 54 p. 100.	$4,2 \times 10^8$
192 . . .	$3,5 \times 10^8$	2 — 2 p. 100; 4 — 48 p. 100; 8 — 40 p. 100; 16 — 10 p. 100.	$2,3 \times 10^9$
216 . . .	$6 \times 10^8$	1 — 2 p. 100; 2 — 10 p. 100; 4 — 60 p. 100; 8 — 20 p. 100; 16 — 8 p. 100.	$3,3 \times 10^9$
240 . . .	$3,5 \times 10^9$	1 — 8 p. 100; 2 — 88 p. 100; 4 — 4 p. 100.	$7,0 \times 10^9$
264 . . .	$6 \times 10^9$	1 — 86 p. 100; 2 — 14 p. 100.	$6,9 \times 10^9$

(1) Il est bien entendu que dans ce qui suit nous entendons par ce mot, utilisé sans doute improprement, non seulement les amas de deux ou plusieurs bacilles, mais également les bacilles isolés.

de la suspension de la culture non diluée. Sur la préparation nous avons compté le nombre des germes dans chaque amas et établi le pourcentage. Nous avons ainsi pu dresser le tableau I ci-dessous donnant la répartition des bacilles et qui nous permet de calculer le nombre total de germes présents dans la suspension d'après l'équation ci-dessous :

$$n \left( \frac{x}{100} \times a + \frac{y}{100} \times b \dots \right) = N$$

$n$  = nombre d'amas dans la suspension ;  $a, b$  = répartitions des germes dans les amas ;  $x, y$  = nombre d'amas contenant le même nombre de germes ;  $N$  = nombre total des germes dans la suspension.

EXPÉRIENCES. — Le tableau II et la figure 1 se rapportent à la croissance du bacille aviaire en milieu de Dubos. Dans la figure

TABLEAU II.

IMPORTANCE de l'ensemencement	TAUX DE DIVISION en fonction du nombre total de germes	K (1)	TAUX D'ACCROISSEMENT en fonction de la masse totale des germes	K (1)
$10^{-3}$ mg. . . .	8 h 28	2,0	40 h 24.	0,416
$10^{-7}$ mg. . . .	5 h. 42	2,8	30 heures.	0,5

(1) K a été calculé d'après l'équation de croissance  $n = n_0 e^{kt}$ .

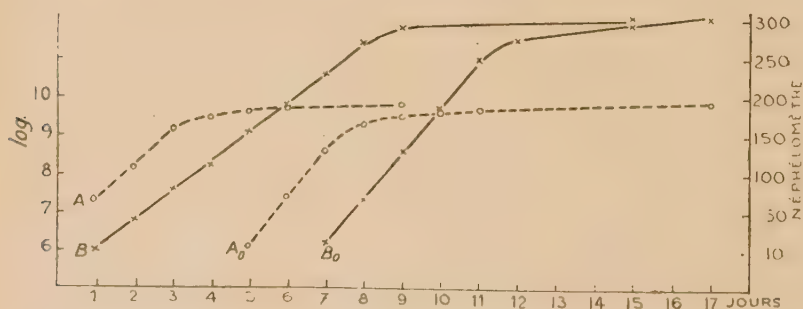


FIG. 1. — A, nombre total des germes (numération) ensemencement  $10^{-3}$  mg. ;  $A_0$ , nombre total des germes (numération) ensemencement  $10^{-7}$  mg. ; B, masse totale des germes (photomètre) ensemencement  $10^{-3}$  mg. ;  $B_0$ , masse totale des germes (photomètre) ensemencement  $10^{-7}$  mg.

les courbes A et  $A_0$  représentent le nombre total des germes, les courbes B et  $B_0$  la masse totale des bactéries, exprimée par la mesure néphélométrique.

L'examen des graphiques montre que le développement du bacille aviaire se fait suivant la loi de la croissance exponentielle.

En ce qui concerne l'influence de la quantitéensemencée, on constate les faits suivants :

1° Le temps de latence est beaucoup plus long avec des ensemencements faibles qu'avec des ensemencements plus importants.

2° La durée absolue de la phase exponentielle des courbes exprimant la masse totale des germes, telles que la méthode néphélométrique a permis de les établir, dépend de la quantitéensemencée.

3° Par contre, la durée de la phase exponentielle des courbes représentant le nombre total des germes vivants est indépendante du nombre des bacilles ensemencés.

4° Au moment de la phase maximum, le nombre des germes en présence est le même, quelle que soit l'importance de l'ensemencement.

On constate que les courbes du nombre des bactéries et de la densité optique, expression de la masse totale bactérienne, ne se superposent pas ; la masse continue à augmenter alors que la culture en fonction du nombre total des germes a (déjà) atteint la phase stationnaire.

Jusqu'à présent, on a toujours évité de se livrer à des comparaisons rigoureuses entre des méthodes aussi différentes que la numération et la néphélométrie.

Tout en admettant qu'il faut ici user de beaucoup de prudence, nous croyons pouvoir expliquer les divergences observées entre les deux types de courbes en tenant compte des observations que nous avons faites dans un travail antérieur sur la morphologie microscopique du bacille aviaire.

Dans la figure 2 nous avons tracé 3 courbes qui représentent :

Courbe A : le nombre total des microbes, obtenu par la méthode que nous avons décrite plus haut.

Courbe B : Le nombre des amas, obtenu par la méthode de McGrady.

Courbe C : La courbe néphélométrique correspondante.

Sur l'abscisse, au quatrième jour, nous avons tracé un repère qui sépare les courbes en deux périodes qui se caractérisent ainsi :

*Période I.* — Après la phase de latence et à la fin de la phase logarithmique, le nombre total des microbes a atteint presque son maximum. Cependant les courbes C et B sont encore en évolution continue. Les observations sur la morphologie microscopique nous révèlent qu'à ce stade la culture a atteint le maximum de la multiplication active. Dès la fin de la phase de latence on a pu assister au processus de division qui conduit à la formation des



torsades ou écheveaux. A partir de ce stade, la culture entre dans la phase de maturation.

*Période II.* — Cette période est caractérisée par la maturation de la culture. Pendant celle-ci, les torsades devenues très fragiles se fragmentent à la moindre agitation de la culture. La courbe B illustre ce fait, continuant à s'élever uniquement par augmentation du nombre des amas (tableau I), qui deviennent réguliers par la taille et par le nombre de germes qu'ils contiennent. Ce moment concorde avec la fin de la phase logarithmique de la courbe B. Pourtant la taille des bactéries intégrées dans les amas n'est pas encore celle d'un bacille adulte. La taille des bactéries continue à augmenter encore pendant un certain temps, ce que montre la

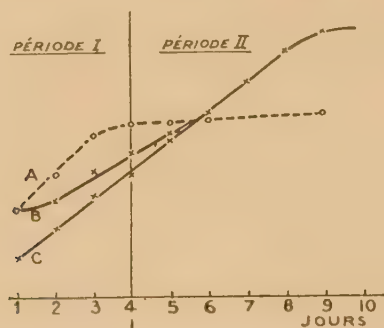


FIG. 2. — A, nombre total des germes; B, nombre d'agglomérats; C, masse totale des germes.

courbe néphélométrique représentant la masse totale bactérienne.

En conclusion, l'étude sur le mode de croissance du bacille aviaire en milieu de culture de Dubos confirme l'existence de deux périodes de développement dont nous avons déjà connaissance par l'étude de la morphologie microscopique : une phase de multiplication suivie par une phase de croissance individuelle et qui trouvent dans les courbes de croissance une expression quantitative. Le décalage observé dans les courbes de croissance obtenues par des méthodes différentes est dû aux modifications morphologiques des germes isolés formant la population bactérienne au cours de sa croissance.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] DUBOS (R.) et GARDNER MIDDLEBROOK. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 334.
- [2] MONOD (J.). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1942.
- [3] HERSHEY (A.) et BRONFENBRENNER (J.). *J. Gen. Physiol.*, 1938, **21**, 721-728.

## ETUDES SUR LE COLLAGÈNE

### III. — TRAITEMENT DE SCLÉROSES EXPÉRIMENTALES PAR UNE COLLAGÉNASE — PREMIERS RÉSULTATS

par MARCELLE DELAUNAY, MAYLIS GUILLAUMIE et ALBERT DELAUNAY (\*).

(Institut Pasteur.)

I. — Que des ferments spécifiques, élaborés principalement par des bactéries anaérobies, soient capables de détruire la substance collagène *in vitro* comme *in vivo*, le fait ne peut plus être mis en doute. Le phénomène, d'observation aisée *in vitro* [1], n'est pas moins facile à reproduire *in vivo*. Il suffit d'injecter par exemple sous la peau normale d'un cobaye ou d'un rat quelques dixièmes de centimètre cube d'un filtrat de culture de *Welchia perfringens*, riche en collagénase. Au bout de quelques heures, le tissu conjonctif imprégné par le filtrat subit une véritable fonte. Sur coupes colorées de ce tissu, on remarque que les fibres de réticuline et de collagène ont totalement ou partiellement disparu, que tout au moins elles n'absorbent plus le Van Gieson.

Ne pourrait-on pas se servir d'une collagénase pour traiter *in vivo* des processus sclérogènes puisque ceux-ci, précisément, se caractérisent, sur le plan histologique, par une hyperproduction des substances de soutien, et surtout du collagène ? Dans quelle mesure une collagénase est-elle capable de freiner l'évolution d'une sclérose ou d'entraîner la résorption d'un nodule scléreux déjà existant ? Telles sont les questions que nous nous sommes posées — et dont l'importance ne peut échapper, compte tenu de la fréquence et de la gravité des réactions sclérogènes, en clinique humaine. Nous apportons ici les premières observations que nous avons faites dans le domaine expérimental.

II. — Pour déterminer chez l'animal un foyer de sclérose, nous avons eu recours à la méthode suivante qui est simple et qui présente, en outre, le grand avantage de fournir des résultats très rapides.

Une solution acétique de collagène préparée à partir des tendons de la queue du rat (par la méthode de Nageotte et Guyon) est mélangée, en parties égales, avec de l'eau salée (2,5 g. de NaCl

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juin 1949.

pour 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée). Un précipité abondant de collagène se produit aussitôt, cette précipitation étant pratiquement totale au bout de quelques heures. La préparation est alors centrifugée à grande vitesse et le culot lavé plusieurs fois avec de l'eau physiologique. Le dernier culot est finalement repris par une petite quantité d'eau physiologique, de manière à obtenir une sorte de pâte fluide, puis injecté (1 cm<sup>3</sup>) sous la peau de rats et de cobayes normaux. Bien entendu, toutes ces opérations sont faites aseptiquement (souvent, par une ultime mesure de prudence, nous

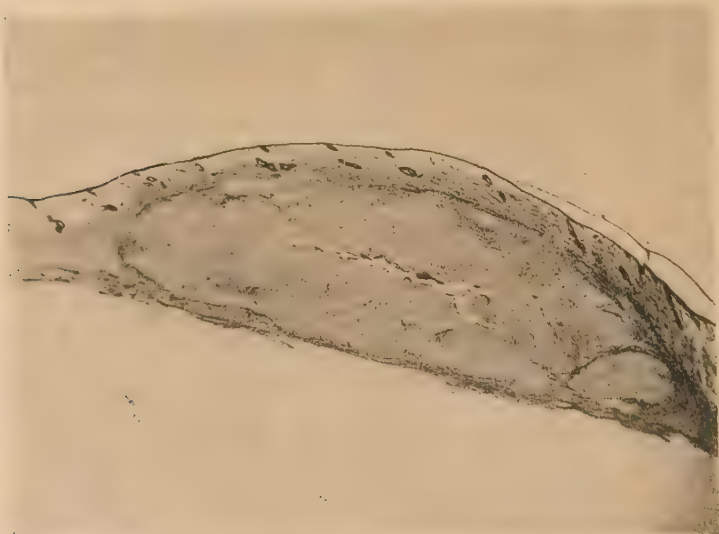


FIG. 1. — Nodule scléreux expérimental provoqué chez le rat au moyen d'une injection sous-cutanée de collagène précipité. (Service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur.)

ajoutions au dernier culot quelques gouttes de pénicilline). En opérant dans ces conditions, nous n'avons jamais observé d'infection secondaire ni d'évolution franchement purulente de la réaction inflammatoire locale.

Aussitôt après son injection, le collagène forme sous la peau de l'animal une petite boule saillante qui ne montre, au début, aucune tendance à se résorber (fig. n° 1). Il donne lieu à diverses réactions cellulaires dans le tissu environnant, dont nous avons précisé la nature au moyen de biopsies espacées dans le temps (prélèvements sur des animaux différents). Assez rapidement, en vingt-quatre heures, des polynucléaires venus du sang infiltrent le collagène, mais ce processus reste dans la règle peu marqué (même lorsqu'il s'agit d'un collagène hétérologue, c'est-à-dire

d'un collagène de rat injecté chez le cobaye). Il est aussi de faible durée : au bout de trois ou quatre jours, les polynucléaires ont pratiquement disparu du foyer. A ce moment, d'autres cellules vont intervenir qui sont des histiocytes-macrophages et des fibroblastes. A leur tour, elles envahissent le collagène. Cette infiltration devient de plus en plus importante, si bien qu'une semaine environ après l'injection du produit, on se trouve en présence d'une organisation cellulaire du collagène tout à fait remarquable.

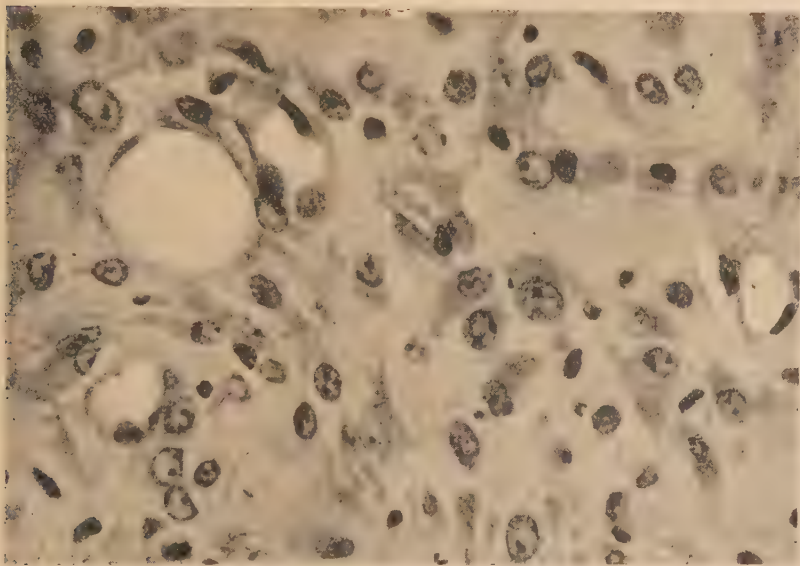


FIG. 2. — Réorganisation cellulaire du collagène précipité, injecté sous la peau du rat. (Service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur. Gross. :  $\times 1.400$ .)

Ce qu'on observe, histologiquement, c'est un véritable foyer scléreux, avec des cellules noyées dans une gangue fibreuse (fig. n° 2). Il n'est anormal que par son mode de production, l'ordre des facteurs ayant été, en somme, inversé. Ici, la réaction cellulaire n'a pas précédé, comme elle le fait dans la règle, la réaction fibreuse ; elle l'a suivie.

Cette méthode de production d'une sclérose expérimentale — déjà suivie par Nageotte et Guyon au cours de leurs recherches sur les greffes — nous paraît tout spécialement recommandable. En tout cas, ce sont des foyers scléreux obtenus de cette manière (et âgés de huit jours environ) que nous avons soumis à l'action d'une collagénase.

III. — Nous nous sommes servis, dans un premier temps,



comme produits collagénasiques, de simples filtrats de culture de *Welchia perfringens*. Mais pour éviter, dans la mesure du possible, la toxicité générale souvent assez grande de ces filtrats, nous n'avons retenu que ceux qui, tout en étant relativement riches en collagénase (richesse démontrée par un examen préalable *in vitro*), ne renfermaient que de petites quantités de léécithinase  $\alpha$  (on sait, en effet, que la richesse d'un filtrat en toxine  $\alpha$  est sans rapport avec sa richesse en collagénase [1]). En pratique, nous avons utilisé les filtrats des souches Am 8 et Mayer.

Ces deux filtrats ont été injectés, purs ou dilués (au 1/10 et au 1/100), sous le volume de 1/4 ou 1/2 cm<sup>3</sup> dans des foyers scléreux âgés de huit jours évoluant soit chez des cobayes, soit chez des rats. Au bout de délais variables (quarante-cinq minutes, quatre heures, sept heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures, etc.) la peau traitée a été excisée et soumise aux manipulations histologiques classiques. La lecture des lames nous a permis de faire les constatations suivantes :

a) Les doses faibles de filtrat ont provoqué localement une très légère réaction inflammatoire (œdème, infiltration de polynucléaires) mais le tissu fibreux n'a pas été sensiblement modifié ;

b) Les doses fortes, au contraire, sont parvenues à altérer ce tissu. En dehors d'un œdème et d'une diapédèse plus importante que dans le premier cas, nous avons noté encore des hémorragies, une nécrose partielle du nodule scléreux (cellules et fibres), un amincissement de la couche épithéliale sus-jacente.

Pour mieux observer l'atteinte particulière du nodule fibreux par le filtrat, nous avons opéré dans une série d'expériences chez des animaux intoxiqués par une dose sub létale d'endotoxine typhique. Ce poison, comme nous l'avons montré [2], inhibe l'émigration leucocytaire. Par là même se trouve grandement facilité l'examen des lésions locales. Nous avons opéré sur des cobayes, l'examen histologique du nodule scléreux étant fait six heures après l'injection du filtrat de *Welchia perfringens* (dans le nodule lui-même) et de l'endotoxine (par voie intrapéritonéale). Sur coupes, nous avons trouvé des nappes hémorragiques plus abondantes que normalement (elles étaient sans doute une conséquence du processus toxique) et — pour les doses fortes de filtrats — des modifications indiscutables de la masse scléreuse. Mais ces modifications ne se limitaient pas aux fibres qui étaient lysées ; elles intéressaient aussi les cellules qui, en grand nombre, étaient mortellement atteintes. En somme, les doses fortes de filtrats provoquaient une nécrose totale du tissu : il ne s'agissait en aucune manière d'une atteinte quasi spécifique des fibres de collagène, ce que nous avions espéré tout d'abord.

Nous avons pu reproduire une nécrose assez comparable à la précédente en injectant chez des animaux témoins, dans le foyer

scléreux artificiel, une dose d'adrénaline suffisante pour arrêter localement tout afflux sanguin [3]. Cette nécrose, d'origine ischémique, rappelait à beaucoup d'égards celles qu'avaient déterminées nos filtrats de *Welchia perfringens*.

Dans ces conditions, nous avons estimé finalement que de tels filtrats ne peuvent être utilisés dans le traitement des processus sclérogènes, sans doute parce qu'ils sont, à la fois, trop pauvres en collagénase et trop riches en principes directement cytotoxiques.

IV. — Nous nous sommes alors mis en quête de filtrats microbiens contenant une collagénase mais dépourvus de substances nocives pour des cellules. Nous avons à ce sujet examiné un très grand nombre de germes (pour la plupart des saprophytes de l'air), une souche de *B. mycoides*, de *B. brevis*, des extraits de champignons, etc. Le tout fut fait en pure perte. Sans doute nos préparations étaient, pour la plupart, non cytotoxiques, mais elles étaient aussi dénuées de toute activité collagénasique (déterminée *in vitro*). Ces recherches — sans utilité quant au but particulier que nous poursuivions — ont néanmoins eu l'intérêt de montrer que les sources bactériennes de collagénase ne sont pas très nombreuses.

V. — Arrivés à ce point de notre travail, nous avons eu la bonne fortune de recevoir de la part de M<sup>lle</sup> E. Bidwell (1) 75 mg. d'une collagénase purifiée de *Welchia perfringens*. Cette préparation desséchée avait, d'après les mesures anglaises, les titres suivants :

28 unités Q par milligramme.

Dose-test K vis-à-vis de 2 unités anti-K (en présence de muscle) : 0,05 mg.

Dose-test K vis-à-vis de 2 unités anti-K (en présence d'azocoll) : 0,02 mg.

1/2.000 de milligramme de ce produit mis en solution dans l'eau physiologique suffisait pour détruire des pastilles de collagène A en huit jours. Son activité collagénasique — d'après notre méthode d'examen — était donc très forte [4].

Avec cette collagénase purifiée, nous avons repris nos essais de traitement des scléroses expérimentales. Voici nos observations et résultats :

a) Nous avons injecté chez 8 rats, dans le nodule scléreux qu'ils portaient sous la peau de l'abdomen, 1 mg. de collagénase purifiée en solution dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique.

Des animaux ainsi traités, 5 sont morts en moins de sept heures, 2 en moins de vingt-quatre heures, 1 a survécu.

(1) Nous tenons à lui renouveler ici tous nos remerciements.

Localement est apparue une fonte extraordinairement importante de tout le tissu conjonctif sous-cutané, avec un décollement considérable de l'épithélium sus-jacent, non seulement abdominale mais encore thoracique. La peau est ainsi devenue d'une minceur extrême et, dans 2 cas, elle a même été le siège d'une ulcération. Sous la peau, le nodule scléreux expérimental, perdant toute attache avec le reliquat du tissu conjonctif adjacent, est devenu une petite masse mobile, ramollie (au bout de sept heures) et en grande partie digérée [au bout de vingt-quatre heures (fig. n° 3)]. Ce nodule isolé, prélevé et placé *in vitro* dans une solution concentrée de collagénase, a disparu en deux jours presque totalement (fig. n° 4).

L'activité biologique de la préparation purifiée que nous avons utilisée apparaît ainsi considérable. Malheureusement, à nouveau, on n'assiste pas à une action purement collagénasique. Le produit, tel quel, garde une toxicité générale très prononcée (qu'il doit sans doute à la petite quantité de toxine  $\alpha$  qu'il contient encore ; il est dépourvu de toxine  $\theta$ ). Il est aussi, à la dose que nous avons mise en œuvre, nettement cytotoxique. Sur coupes du tissu traité la plupart des cellules étaient dégénérées.

Nous avons recueilli des faits pratiquement identiques en opérant sur des cobayes. Nous nous sommes demandé alors si des doses de produit nettement plus faibles, dépourvues d'une action toxique générale, gardaient pourtant le pouvoir d'exercer localement, *in vivo*, une action collagénasique appréciable.

b) 8 rats, porteurs d'un foyer scléreux sous-cutané, ont reçu localement soit 0,1 mg., soit 0,02 mg. de collagénase purifiée dissoute dans l'eau.

Cette fois, tous les animaux ont survécu. Les doses de 0,1 mg. ont entraîné une nécrose et une fonte assez nette du nodule de collagène, mais dans ce nodule les fibres n'étaient pas seules atteintes ; un grand nombre de cellules étaient mortes. Dans les masses fibreuses, traitées par 0,02 mg. de produit, la nécrose a été nulle, les cellules apparemment ont conservé toute leur vitalité, mais le collagène n'a été que très partiellement lysé.

VI. — Quelles conclusions peut-on tirer de ces diverses observations ? Nous proposons les suivantes :

1° Que des collagénases méritent d'être utilisées pour entraîner la résorption au moins partielle d'une sclérose, en principe, le fait peut être admis. Cependant l'état présent de nos recherches nous oblige à formuler certaines réserves en ce qui concerne l'application d'une telle thérapeutique en clinique humaine.

D'une part, une collagénase ne peut guère exercer son action que localement. Il serait, croyons-nous, tout à fait illusoire d'attendre du ferment une action étendue à tout l'organisme. Même une collagénase très puissante sera sans doute inefficace

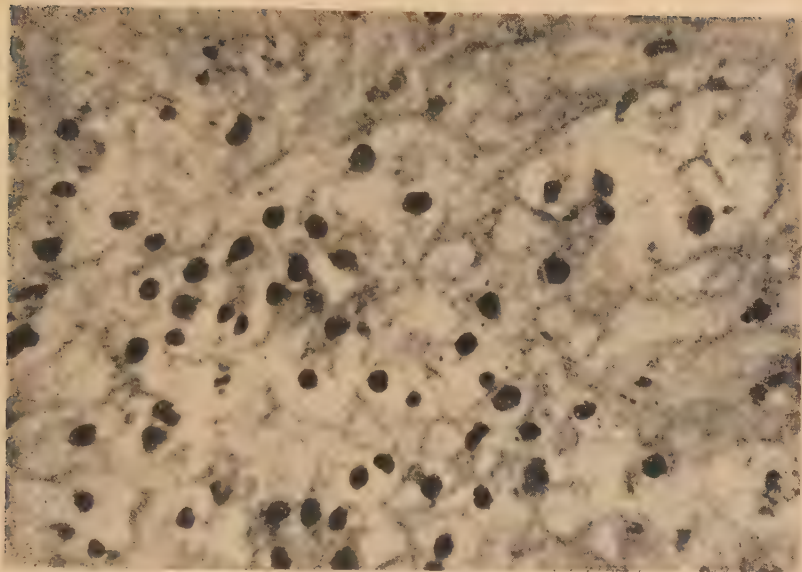


FIG. 3. — Lyse collagénasique d'un nodule scléreux expérimental; premier stade. (Service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur. Gross. :  $\times 1.400$ .)

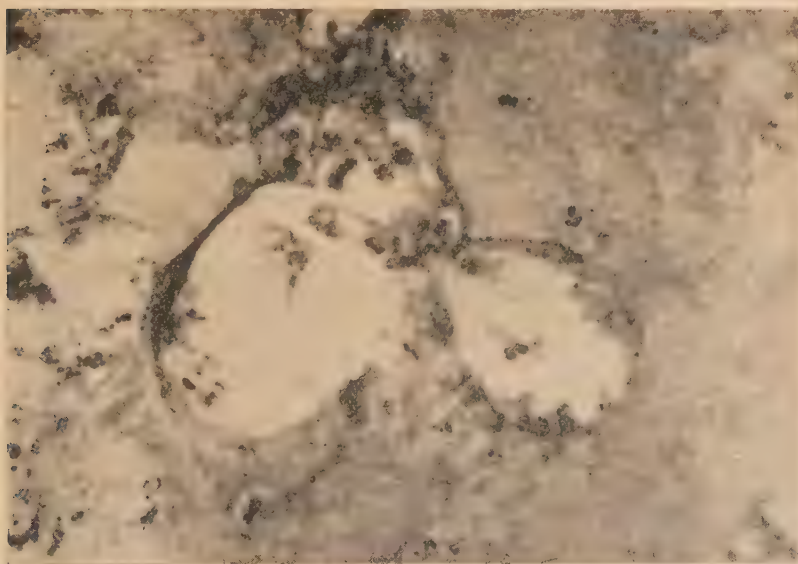


FIG. 4. — Lyse collagénasique d'un nodule scléreux expérimental; dernier stade. (Service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur. Gross. :  $\times 1.400$ .)



pour lutter contre une sclérose diffuse (artériosclérose, par exemple).

D'autre part, au sujet de l'action locale elle-même, l'emploi de collagénases très purifiées, totalement débarrassées d'impuretés cytotoxiques, s'impose. Sinon les lésions produites par le complexe injecté risquent fort de repousser au second plan le résultat favorable que représenterait la lyse fibreuse. Mais déjà, nous savons qu'en Angleterre les chimistes sont parvenus à obtenir des collagénases très pures, beaucoup plus pures que celles que nous avons employées pour ces expériences ; et déjà des médecins ont mis en œuvre chez l'homme ces produits associés à une fibrinolyse (ainsi dans le traitement de méningites cloisonnées).

2° A notre avis, l'application d'une collagénase devrait avoir pour principales indications, soit des cicatrices vicieuses ou chéloïdiennes, soit des disques bloqués. Dans ce cas, le traitement chimique pourrait revêtir un intérêt au moins égal, peut-être même supérieur, à l'excision chirurgicale ; la fonte diastasique représenterait certes une méthode thérapeutique singulièrement élégante... Théoriquement, la pauvreté cellulaire et vasculaire de ces tissus fibreux justifierait l'emploi d'une collagénase imparfaitement purifiée. Il n'en reste pas moins vrai que l'obtention de produits très purs est extrêmement souhaitable ; aussi ne commencerons-nous nos essais chez l'homme que lorsque nous aurons de tels produits à notre disposition.

#### RÉSUMÉ.

Les auteurs ont essayé de déterminer la résorption de scléroses expérimentales au moyen d'une collagénase bactérienne.

Leurs résultats, sans être excellents, indiquent pourtant que les collagénases, lorsqu'elles auront subi une purification très poussée, pourront servir dans le traitement de certaines affections humaines, en application locale.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ces *Annales*, 1949, **76**, 16.
- [2] Ces *Annales*, 1947, **73**, 565.
- [3] *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 314.
- [4] Ces *Annales*, 1949, **77**, 220.

**SUR L'APPARITION TARDIVE  
DE VARIANTES BACILLAIRES RÉSISTANTES  
AU COURS DU TITRAGE  
DE LA STREPTOMYCINO-SENSIBILITÉ  
DU BACILLE TUBERCULEUX**

par G. CANETTI et A. SAENZ (\*).

(*Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la tuberculose*).

On sait que la méthode habituelle de titrage de la streptomycino-sensibilité du bacille de Koch consiste à isoler le bacille sur milieu à l'œuf, puis à l'ensemencer dans plusieurs tubes de milieu liquide contenant des taux croissants de streptomycine. La lecture des tubes est faite au quinzième jour, et l'on désigne par streptomycino-sensibilité du bacille, ou *titre*, la quantité de streptomycine la plus faible (en  $\gamma$  par centimètre cube de milieu) qui empêche la multiplication des germes : c'est celle qui est contenue dans le premier tube de milieu demeuré sans culture. Or, il n'est pas rare que des tubes restés négatifs le quinzième jour montrent une culture nette le trentième, et il est presque de règle qu'il y ait à cette date, dans l'un ou l'autre tube resté négatif, apparition de *colonies isolées*. Nous étudions, dans ce travail, la fréquence et la signification de ces cultures tardives.

**MATÉRIEL ET MÉTHODE.** — Les souches de bacilles sur lesquelles porte le titrage proviennent de crachats de tuberculeux pulmonaires en cours de streptomycinothérapie. Les crachats sont traités par l'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant dix à vingt minutes, neutralisés par de la soude à 30 p. 100 en présence de teinture de tournesol, selon la méthode de Saenz et Costil, puis ensemencés sur 4 tubes de Löwenstein. La culture ainsi obtenue est repiquée sur pomme de terre glycinée (le repiquage portant sur le plus grand nombre de colonies possible). De la culture sur pomme de terre, apparue en général en huit à quinze jours, 10 centigrammes sont prélevés et dilués dans du sérum physiologique de telle manière qu'il y ait 1/10 de milligramme de bacilles

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 mai 1949.

(poids humide) par 1/10 de centimètre cube de sérum ; 2/10 de centimètre cube de cette dilution (soit 2/10 de milligramme de bacilles) sont ensemencés dans chaque tube de milieu de Youmans [1], contenant 5 centimètres cubes de milieu additionnés de streptomycine. On ensemence ainsi 12 tubes de Youmans, contenant respectivement : 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 et 1.000  $\gamma$  de streptomycine par centimètre cube de milieu. Dans quelques cas, des tubes titrant 2.000, 5.000, 10.000 et 20.000  $\gamma$  de streptomycine ont également été ensemencés.

Le nombre de souches titrées a été de 153. De ces titrages, 55 n'ont été lus qu'au quinzième jour ; pour les autres, 33 se sont, dès cette date, avérés positifs dans *tous* les tubes ensemencés (souches très résistantes), de sorte qu'il ne pouvait y avoir positivité tardive. C'est pour les 65 titrages restants que nous donnons les résultats comparés au quinzième et au trentième jour.

RÉSULTATS. — Les changements au trentième jour sont de deux ordres. Dans certains cas, des tubes négatifs quinze jours auparavant montrent des cultures nettes : cultures qui, déposées au fond du tube, se dispersent par agitation en donnant un aspect en « tourbillon de neige » caractéristique, sans troubler la limpidité du milieu. (Un trouble du milieu de Youmans indique qu'il y a surinfection). Bien plus souvent, il n'y a pas culture aussi abondante, mais on note dans un ou plusieurs tubes l'apparition de *colonies isolées*. Ces colonies, déposées au fond du tube, se dispersent par agitation ; elles consistent en de petits disques arrondis blanc opaque, à contours légèrement effilochés, de 1 à 2 millimètres de diamètre ; elles sont d'autant plus volumineuses qu'elles sont plus rares. On n'en note, le plus souvent, que quelques unités, souvent une seule ; lorsqu'il en existe plus de 10, elles sont difficiles à dénombrer exactement en raison de leur mouvement ; lorsqu'il en existe plus d'une cinquantaine, l'aspect devient celui d'une culture globalement positive, chaque colonie étant, dans ce cas, plus petite et moins bien individualisée.

Les résultats observés sont les suivants. Il y a apparition de *cultures globalement positives* vingt-cinq fois, soit dans 38,4 p. 100 des cas. Ces cultures portent quatorze fois sur 1 tube, cinq fois sur 2, quatre fois sur 3 et deux fois sur 4 tubes ; il s'agit toujours des tubes les plus proches, pour ce qui est de leur concentration en streptomycine, de ceux qui sont positifs dès le quinzième jour. Ces cultures tardives sont peu abondantes — elles le sont bien moins que celles du quinzième jour, gardées à l'étuve et revues au trentième.

L'existence de *colonies isolées* est notée cinquante-cinq fois, soit dans 84,6 p. 100 des cas. Elles existent le plus souvent dans 1, 2

ou 3 tubes, très rarement dans tous ; elles prédominent, en général, et en fréquence et en nombre, dans les 2 ou 3 tubes les plus proches de ceux où il y a culture globale (qu'elle soit précoce ou tardive). Fait important, dans les tubes les plus éloignés, c'est-à-dire les plus riches en streptomycine, elles sont distribuées très irrégulièrement, ne marquant qu'une prédilection modérée pour les concentrations de streptomycine les plus faibles. Elles existent dans 27 p. 100 des cas sur le tube de Youmans titrant 1.000  $\gamma$  de streptomycine, dans 40 p. 100 sur le tube 500, dans 30 p. 100 sur le tube 200, dans 42 p. 100 sur le tube 100 et dans 44 p. 100 sur le tube 50, différences peu considérables. Dans la grande majorité des cas, il n'existe dans chaque tube que 1, 2 ou 3 colonies. On les observe aussi bien dans les cas où existe en plus, dans des tubes à concentration streptomycinique moindre, une *culture globale* tardive, que dans les autres cas : elles n'ont fait défaut qu'une fois sur 25 ; toutefois, elles n'ont pas pu être observées six fois sur 25, parce que les tubes les plus riches en streptomycine étaient le siège d'une culture globale ; mais il est vraisemblable que si des concentrations encore plus fortes de streptomycine avaient été ensemencées dans ces cas, il y aurait eu, dans quelques tubes, apparition de colonies isolées. *Au total, sur les 65 souches titrées, 3 seulement, soit 4,6 p. 100 n'ont montré dans aucun de leurs tubes de croissance nouvelle entre le quinzième et le trentième jour.* Les résultats qui viennent d'être donnés sont détaillés dans le tableau I.

DISCUSSION. — 1° *Nature des colonies tardives.* — A quoi répondent ces cultures tardives ? *A priori*, elles peuvent être dues, ou bien à des variantes sensibles du bacille, initialement inhibées, mais non tuées par la streptomycine, et auxquelles une inactivation secondaire de l'antibiotique permettrait de prendre un tardif essor ; ou bien, à des variantes résistantes poussant lentement, d'où leur apparition tardive.

La première explication peut être exclue. La streptomycine du milieu de Youmans n'est pas inactivée par un mois d'étuve à 37°. Si, dans un tube de Youmans titrant 100, 500 ou 1.000  $\gamma$  de streptomycine, ensemencé d'une souche de bacilles tuberculeux titrant 10, et demeuré de ce fait négatif au bout d'un mois d'étuve, on fait un *nouvel ensemencement* de bacilles sensibles, cet ensemencement reste encore négatif ; et cette absence de culture n'est pas due à une altération du milieu ; car si, dans un tube de Youmans titrant 10, ensemencé d'une souche de bacilles titrant 1 et resté, de ce fait, négatif au bout d'un mois, on fait un ensemencement de bacilles *résistants* (titrant par exemple 500), *la culture pousse fort bien*, preuve de ce que l'absence de culture, dans le premier cas, n'était pas attribuable à une altération du milieu, mais bien



TABLEAU I. — Cultures et colonies isolées apparaissant tardivement au cours du titrage de la streptomycino-sensibilité.

NUMÉRO de la souche	DOSE de streptomycine reçue par le malade en grammes	TITRE au 15 <sup>e</sup> jour	TITRE au 30 <sup>e</sup> jour	NOMBRE DE COLONIES ISOLÉES apparues au 30 <sup>e</sup> jour dans les différents tubes de Youmans-streptomycine											
				0,5γ	1γ	2γ	5γ	10γ	20γ	50γ	100γ	200γ	500γ	1.00γ	
4	147	2	2	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	2	2	2	—	—	± 15	5	0	0	0	0	0	0	0	
19	51	2	2	—	—	7	6	3	1	0	0	0	0	0	
27	57	20	200	—	—	—	—	—	+	+	+	± 20	7	7	
29	17	1	1	—	± 15	± 10	± 30	0	0	0	0	0	0	0	
32	8	2	10	—	—	+	+	0	± 10	0	0	0	1	1	
35	57	2	10	—	—	+	+	± 20	0	1	0	3	0	0	
40	4	2	5	—	—	+	± 20	± 20	± 20	± 20	± 20	± 20	± 20	± 20	
41	54	10.000	> 20.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
43	21	100	> 1.000	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	
51	39	5	5	—	—	—	10	4	7	5	6	4	0	0	
55	51	100	100	—	—	—	—	—	—	± 30	0	0	0	0	
61	54	200	> 1.000	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	
62	58	100	200	—	—	—	—	—	—	+	+	4	0	0	
64	90	5	5	—	—	—	4	0	0	1	1	1	3	3	
66	35	100	100	—	—	—	—	—	—	—	0	4	0	0	
68	90	5.000	5.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
79	18	2	5	—	—	+	0	0	0	0	0	0	0	0	
82	0	0,5	0,5	7	0	3	0	4	0	0	0	0	1	1	
83	30	100	200	—	—	—	—	—	—	+	± 40	2	2	2	
84	15	200	200	—	—	—	—	—	—	—	± 20	0	0	0	
85	214	200	200	—	—	—	—	—	—	—	0	6	6	6	
89	63	200	200	—	—	—	—	—	—	—	6	8	8	8	
90	63	20	20	—	—	—	—	—	0	2	1	0	0	0	
91	60	2.000	10.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
93	60	200	> 1.000	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	
99	80	5	5	—	—	—	± 20	± 30	± 20	± 20	± 20	± 10	± 10	± 10	
96 <sub>A</sub>	132	20	20	—	—	—	—	—	± 15	2	1	0	1	1	
96 <sub>B</sub>	132	1.000	> 1.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
98	80	200	200	—	—	—	—	—	—	—	—	4	0	0	
100	65	2	2	—	—	± 20	± 20	0	0	1	0	2	0	0	
101 <sub>A</sub>	128	10	20	—	—	—	—	+	± 40	± 30	± 40	± 40	± 20	± 20	
102	100	10	10	—	—	—	—	± 20	± 25	± 10	0	0	1	1	
104	80	20	20	—	—	—	—	—	± 40	± 40	± 10	0	0	0	
108	80	10	20	—	—	—	—	+	0	9	± 10	1	0	0	
114	50	200	200	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	
121	83	500	500	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	
135	60	2	5	—	—	+	± 30	0	0	0	4	0	1	1	
138	80	200	1.000	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	
156	42	5	100	—	—	—	+	+	+	+	± 10	0	6	6	
157	0	5	5	—	—	—	0	0	0	0	1	0	0	0	
159	46	1	2	—	+	3	0	0	1	0	0	0	1	1	
160	34	2	2	—	—	± 15	0	± 25	0	± 15	0	0	0	0	
161	13	1	1	—	± 30	± 30	0	infecté.	0	0	0	0	0	0	
163	51	5	5	—	—	—	± 30	0	0	0	1	0	0	0	
165	58	200	500	—	—	—	—	—	—	—	—	+	1	1	
174	13	1	1	—	± 30	3	0	infecté.	0	0	0	0	infecté.	infecté.	

Le signe — indique les tubes positifs au 15<sup>e</sup> jour.Le signe + indique les tubes où il y a culture globale au 30<sup>e</sup> jour.

Le signe ± placé devant certains chiffres indique que ces chiffres sont approximatifs.

NUMERO de la souche	DOSE de streptomycine reçue par le malade en grammes	TITRE au 15 <sup>e</sup> jour	TITRE au 30 <sup>e</sup> jour	NOMBRE DE COLONIES ISOLÉES apparues au 30 <sup>e</sup> jour dans les différents tubes de Youmans-streptomycine										
				0,5 γ	1 γ	2 γ	5 γ	10 γ	20 γ	50 γ	100 γ	200 γ	500 γ	1.000 γ
176	9	10	10	—	—	—	—	0	1	0	0	0	0	0
178	15	1	1	—	± 20	8	0	0	0	0	0	0	1	1
179	15	2	5	—	—	+	4	5	2	0	0	0	0	0
188	42	50	50	—	—	—	—	—	—	2	6	0	0	0
190	41	5	10	—	—	—	+	± 20	0	0	0	0	0	0
202	42	10	10	—	—	—	—	4	0	0	0	0	0	0
206	26	10	10	—	—	—	—	0	1	0	0	0	0	1
209	48	100	100	—	—	—	—	—	—	± 10	0	0	1	0
210	82	20	20	—	—	—	—	—	2	3	0	0	1	1
211	45	100	100	—	—	—	—	—	—	—	2	0	0	0
214	128	10	10	—	—	—	—	3	2	1	0	0	0	0
228	50	10	10	—	—	—	—	0	1	0	0	0	1	0
229	145	10	10	—	—	—	—	± 20	1	1	1	0	0	0
232	85	20	20	—	—	—	—	—	1	0	0	0	0	1
233	60	5	20	—	—	—	+	+	1	0	0	± 15	2	3
234	100	500	500	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	0
238	30	1.000	> 1.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
240	56	50	100	—	—	—	—	—	—	+	1	0	0	0

à une persistance d'activité de la streptomycine. Cette expérience, répétée sept fois, a toujours donné le même résultat. La streptomycine n'est donc pas inactivée par un mois d'étuve dans le milieu de Youmans.

D'autre part, on peut démontrer directement que les cultures et colonies tardives correspondent bien à des variantes résistantes du bacille. Quelques colonies sont aspirées à l'aide d'une pipette, écrasées dans un peu de sérum physiologique et ensemencées dans des tubes de Youmans dont la concentration en streptomycine est plus élevée que celle du tube d'origine, ainsi que dans un tube témoin. Ce titrage a été fait dans 15 cas ; les résultats sont consignés dans le tableau II ci-joint. On voit que, dans 14 cas, il y a bien eu culture dans les tubes à concentration de streptomycine très forte ; toujours, sauf deux fois, la culture est même allée jusqu'à la concentration *la plus forte* ensemencée. Dans le seul cas discordant (souche 102, colonies isolées du tube 50) il n'y a eu culture ni sur les tubes avec streptomycine, ni sur le tube témoin ; il est vraisemblable que les colonies étaient restées collées sur la pipette et qu'aucun des tubes n'avait reçu de semence.

Ainsi, les cultures ou colonies isolées apparaissant tardivement répondent bien à des variantes résistantes du bacille.

2° *Mode d'apparition des variantes bacillaires résistantes.*

TABLEAU II. — Titrage de colonies isolées apparues tardivement.

NUMÉRO de la souche et titre	TITRE du tube d'où proviennent les colonies tardives	TITRE EN STREPTOMYCINE (EN $\gamma$ PAR CM <sup>3</sup> ) des tubes de Youmans sur lesquels les colonies ont été ensemencées, et résultat de l'ensemencement (au 15 <sup>e</sup> jour)									
6 (Titre 2)	100	0 +++			100 ++		500 ++	1 000 ++			
32 (Titre 2)	20	0 +	10 +	50 +		200 +		1.000 —			
40 (Titre 2)	50	0 $\pm$		50 +		200 +	500 +	1.000 $\pm 20$			
51 (Titre 5)	100	0 +			100 +	200 +	500 +	1.000 +			
64 <sub>B</sub> (Titre 5)	5	0 +++			100 ++		500 ++	1.000 ++			
83 (Titre 100)	200	0 +				200 +	500 +	1 000 +			
89 (Titre 200)	500	0 ++					500 ++	1.000 +	2 000 +	5 000 $\pm 30$	
102 (Titre 10)	10	0 ++	10 ++		50 $\pm 10$	100 $\pm 20$	500 $\pm 20$				
102 (Titre 10)	50	0 —			50 —	100 —	500 —	1 000 —			
104 (Titre 20)	50	0 +++			50 +++	100 +++	500 +++				
104 (Titre 20)	100	0 ++				100 ++	500 +	1.000 $\pm$	2.000 +		
108 (Titre 10)	50	0 ++			50 ++	100 ++	500 ++	1.000 +			
108 (Titre 10)	100	0 +++				100 +++	500 ++	1.000 ++	2 000 ++		
156 (Titre 5)	100	0 +++				100 ++	500 ++	1.000 ++			
157 (Titre 5)	100	0 ++				100 infecté	200 +	1 000 —			

*Considérations d'ordre pratique.* — Les faits qui viennent d'être relatés sont en accord avec ce que l'on sait aujourd'hui sur le mode d'apparition des variantes bacillaires résistantes. Plusieurs auteurs, Pyle [2], Vennesland, Ebert et Bloch [3], Yegian et Vanderlinde [4], Youmans et Williston [5], ont montré que ces variantes existent dans presque toutes les souches *avant tout traitement à la streptomycine*, quoique en très petit nombre. (Deux de nos cas, les n<sup>os</sup> 82 et 157, concernent également des souches isolées avant tout traitement ; toutes deux montrent des variantes résistantes, apparues dans le tube 500  $\gamma$  pour le premier cas, dans le tube 100  $\gamma$  pour le second. Il s'agit chaque fois d'une seule colonie.) La streptomycinothérapie opère dans les lésions tuberculeuses une véritable sélection ; en détruisant un grand nombre d'individus sensibles, elle augmente la proportion d'individus résistants. Il se peut que ces individus résistants, s'ils ne sont pas détruits par les phagocytes de l'organisme, se trouvent, du fait de la diminution du nombre des individus sensibles, dans de meilleures conditions pour se multiplier. De toute manière, les individus résistants seront proportionnellement de plus en plus nombreux, et auront ainsi de plus en plus de chances d'apparaître dans les parcelles de crachatsensemencées. S'ils sont très nombreux, ils donneront une culture globalement positive ; s'ils sont très rares, ils ne donneront que des colonies isolées, éparpillées dans les tubes au hasard de la semence. Les faits relatés ici prouvent que les milieux liquides, tout au moins celui de Youmans, ne sont nullement inaptes à extérioriser ces croissances tardives ; ils s'avèrent même à cet égard d'une très grande sensibilité. Leur seul inconvénient est de rendre imprécis le dénombrement des colonies, lorsqu'il en existe plus d'une dizaine.

Pourquoi ces cultures ou colonies n'apparaissent-elles parfois que tardivement ? Pyle a montré que les variantes résistantes poussent plus lentement dans les milieux contenant de la streptomycine que les variantes sensibles dans les milieux qui n'en contiennent point. La chose est exacte, mais si elle était la seule explication du phénomène, on comprendrait mal comment certaines souches très résistantes donnent, dans des tubes titrant 1.000  $\gamma$ , des cultures luxuriantes *dès le septième jour*, éventualité nullement rare. En fait, c'est le nombre minime d'individus très résistantsensemencés qui doit, dans nos cas, expliquer l'apparition très tardive des colonies, les semences peu abondantes poussant toujours plus lentement que les semences abondantes, pour des raisons d'ailleurs inconnues.

Y a-t-il un rapport entre la dose globale de streptomycine administrée au malade et le nombre, ainsi que le titre, des variantes résistantes observées dans ses crachats ? Nous étudions ce pro-



blème ailleurs [6] ; disons cependant que si, d'une manière générale, on observe d'autant plus de souches résistantes que les doses globales de streptomycine administrées ont été plus fortes, il ne s'agit là que d'une relation d'ordre statistique, admettant de nombreuses exceptions ; surtout, elle ne vaut que pour les variantes résistantes présentes dans les crachats en assez grand nombre pour donner une culture *globalement positive* ; pour les autres, celles qui sont très rares et ne donnent que des colonies isolées, les hasards de leur distribution dans les fragments de semence sont trop grands pour qu'on ait des chances d'observer avec elle la même relation, tout au moins pour le nombre de cas étudié dans un travail comme le nôtre.

Enfin, on doit s'interroger sur les conséquences pratiques des constatations relatées. L'apparition de cultures au trentième jour doit-elle inciter à modifier la technique courante de titrage de la streptomycino-sensibilité ? Y a-t-il lieu de reculer systématiquement jusqu'au trentième jour la lecture définitive des tubes ? Il ne le semble pas, parce que les cultures nouvelles n'existent, le plus souvent, que dans 1 ou 2 tubes (19 cas sur 25), ce qui n'a aucune portée pratique ; deux fois seulement, on l'a vu, il y a eu culture tardive dans 4 tubes, d'où modification sensible du titre de la souche. Or, si l'on ajoute à nos 65 titrages les 33 où la culture était positive dans tous les tubes dès le quinzième jour, les 2 cas signalés représentent 2,3 p. 100 du total, proportion insignifiante. Quant aux colonies isolées apparaissant tardivement, elles ne sauraient en aucune manière constituer un « titre » de la souche ; elles ne représentent le plus souvent qu'une proportion infime du total de la population bactérienne (par colonie, 1 bacille sur  $10^6$  à  $10^9$  germes ensemencés, pour une semence de 2/10 de milligramme). Leur constatation est d'un intérêt théorique considérable pour la compréhension du mode d'apparition de la streptomycino-résistance ; mais, en pratique, leur présence n'indique en rien que la résistance est déjà apparue, ni même qu'elle apparaîtra nécessairement en cas de poursuite du traitement. Nos constatations montrent, toutefois, qu'il y a lieu d'insister davantage que par le passé sur l'aspect quantitatif du phénomène de la résistance et, en particulier, sur la proportion d'individus résistants sur le total des bacilles présents : à cet égard, les milieux solides streptomycinés pourraient s'avérer d'une grande utilité, car ils permettent, mieux que les milieux liquides, une évaluation exacte du nombre d'individus sensibles et d'individus résistants respectivement en présence dans une souche donnée.

Résumé. — 1° Lors du titrage sur milieu de Youmans de la streptomycino-sensibilité de souches de bacilles tuberculeux, pro-

venant de phthisiques en cours de traitement par l'antibiotique, on note fréquemment l'apparition de cultures nouvelles entre le quinzième et le trentième jour (dans 58,4 p. 100 des 65 cas étudiés). On note plus fréquemment encore l'apparition de colonies isolées (dans 84,6 p. 100 des cas).

2° Ces cultures ou colonies représentent des variantes résistantes du bacille, poussant tardivement.

3° La constatation de ces croissances tardives renseigne sur le mode d'apparition de la streptomycino-résistance, mais n'a pas d'incidences pratiques sur la technique du titrage, réserve faite de l'intérêt croissant que pourrait prendre dans l'avenir l'emploi de milieux streptomycinés solides.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] YOUNG (G. P.) et KARLSON (A. G.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 529.
- [2] PYLE (M. N.). *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, 1947, **22**, 465.
- [3] VENNESLAND (K.), EBERT (R. H.) et BLOCH (R. G.). *Science*, 1947, **106**, 476.
- [4] YEGIAN (D.) et VANDERLINDE (R. J.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 177.
- [5] YOUNG (G. P.) et WILLISTON (E. H.). *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1948, **68**, 458.
- [6] SAENZ (A.) et CANETTI (G.). *Rev. Tub.*, 1949, **13**, 503.

**TRANSMISSION DE *SPIROCHÆTA DUTTONI*  
VAR. *CROCIDURÆ*  
PAR L'ORNITHODORE ET PAR LE POU;  
CONSIDÉRATIONS SUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE  
DE LA FIÈVRE RÉCURRENTE A POUX**

par H. BOIRON.

(Institut Pasteur de l'A.O.F. Dakar.)

I. — HISTORIQUE.

La transmission du spirochète de Dutton a déjà fait l'objet d'importantes recherches. Cook est, à notre connaissance, le premier à envisager, dès janvier 1904, le rôle possible d'*Ornithodoros moubala* dans la transmission de l'infection ; en novembre de la même année, Ross et Milne attribuent la fièvre récurrente aux piqûres de cet acarien, rôle que Dutton et Todd démontrent, en 1905, par des expériences demeurées classiques. Brumpt en 1908, Drake en 1914 transmettent *Spirochaeta duttoni* par les piqûres d'*Ornithodoros savignyi*. Brumpt, en 1926, transmet le spirochète de la musaraigne par inoculation d'un broyat de nymphes d'*Ornithodoros moubala*, puis d'un broyat de nymphes d'*Ornithodoros erraticus*, infectées un mois plus tôt ; en 1927, il réussit à transmettre le spirochète de Dutton par inoculation d'un broyat d'*Ornithodoros turicata*. En 1927, Nicolle et Anderson, puis en 1930, Nicolle, Anderson et Colas Belcour transmettent le spirochète de Dutton par la piqûre de l'ornithodore, et en particulier par celle d'*Ornithodoros erraticus*. A Dakar, en 1932, Durieux découvre *Ornithodoros erraticus* dans les terriers de rongeurs et montre à nouveau que la maladie est due à la piqûre de cette tique. Une nouvelle preuve est encore apportée en 1933 par Mathis, Durieux et Advier qui infectent l'homme par piqûre de tiques trouvées dans la nature.

D'autres arthropodes ont également été incriminés. En 1911, Schuberg et Kuhn montrent que les spirochètes restent vivants chez la mouche stomoxe, mais qu'ils ne peuvent être transmis par piqûre. En 1927, Rosenholz et Gilbert constatent que les punaises ayant absorbé du sang virulent se montrent infectantes très long-

temps ; mais il faut broyer les punaises infectées et en frictionner la peau scarifiée ou épilée pour transmettre la maladie ; l'infection n'est transmise ni par piqûre, ni par les déjections ; elle n'est pas héréditaire. En 1928, Wollman, Anderson et Colas Belcour observent la survie des spirochètes récurrents pendant quarante-huit heures chez la mouche stomoxe. Kleine et Krause signalent, en 1934, que de jeunes punaises nourries sur souris infectées conservent le spirochète récurrent vivant de vingt-huit à quatre-vingts jours, que leur broyat inoculé à des souris saines est susceptible de provoquer la maladie ; la punaise adulte ne conserve le spirochète que six jours ; l'infection n'est pas héréditaire. Boné constate, en 1939, que le spirochète de Dutton peut persister virulent chez *Argas reflexus* et *Argas persicus*, mais que l'infection n'est pas héréditaire et que la transmission n'est possible ni par piqûre, ni par inoculation du liquide coxal ; *Rhipicephalus sanguineus* peut s'infecter au stade nymphal, mais pas au stade larvaire et sa piqûre n'est pas susceptible de provoquer l'infection ; enfin, les punaises et les mélophages sont, eux aussi, incapables de transmettre le spirochète de Dutton par piqûre.

Le rôle du pou a également été recherché. En 1912, Nicolle, Blaizot et Conseil nourrissent des poux sur un singe infecté de *Spirochæta duttoni* ; ces poux sont ensuite examinés à l'ultramicroscope du huitième au quinzième jour de l'infection, aucun d'eux ne présente de spirochètes ; il n'a pas été pratiqué d'inoculation des poux à des animaux. Nicolle et Anderson, en 1927, nourrissent un lot important de poux sur un singe infecté de spirochète de Dutton ; ces poux, examinés du septième au seizième jour, ne montrent pas de spirochète ; un jeune macaque inoculé sous la peau et à la surface des conjonctives avec le broyat de 97 poux du septième au seizième jour ne fait ni infection visible, ni infection inapparente, puisque son sang n'a pas infecté un rat ; une deuxième expérience faite dans les mêmes conditions est également négative. Les mêmes auteurs tentent, d'autre part, la transmission, par le pou, du spirochète de la musaraigne que nous savons actuellement n'être qu'une variété du spirochète de Dutton (Nicolle, Mathis et Anderson) ; deux essais se montrent négatifs. En 1928, Mathis relate deux essais de transmission du spirochète de la musaraigne par le pou ; les singes inoculés avec les broyats des poux infectés ont fait, dans les deux cas, une infection inapparente révélée par la seule inoculation du sang de ces singes à la souris. Et Mathis conclut que le fait pour le pou de transmettre expérimentalement le spirochète de Dutton n'indique pas que cet insecte joue un rôle dans la transmission naturelle de la fièvre récurrente à tiques, mais que si le spirochète finissait par s'adapter à l'organisme du pou, celui-ci arriverait à faire, d'une maladie seulement endémique, une véritable maladie épidémique. Malheureusement,



Mathis n'a jamais pu mettre en évidence la présence du spirochète chez le pou ; en outre, les résultats positifs des inoculations ont tous été obtenus chez la souris grise qui est susceptible d'être infectée naturellement, son étude n'emporte donc pas la conviction. Signalons également les travaux de Baltazard et de ses collaborateurs (1) qui, expérimentant non avec le spirochète de Dutton mais avec des souches de *Spirochæta microti*, de *Spirochæta merionesi*, de *Spirochæta turicata* et de *Spirochæta hermsi* sorties d'ornithodores, ont réussi à plusieurs reprises la transmission du spirochète par l'intermédiaire du pou. Enfin, au moment où nous adressions cette note à la publication, nous avons appris que R. B. Heisch et P. C. Garnham avaient réussi à sept reprises la transmission par le pou d'une souche de *Spirochæta duttoni* isolée de l'homme ; ces auteurs ont noté que même après plusieurs passages chez un hôte anormal le spirochète conserve les caractères d'un spirochète à tiques.

## II. — EXPÉRIENCES DE TRANSMISSION.

Depuis 1946, nous avons fait à l'Institut Pasteur de Dakar 5 essais de transmission du spirochète de Dutton. Dans nos 3 premières expériences qui remontent, la première à juin 1946, la seconde à décembre 1946 et la troisième à avril 1948, nous avons réussi à transmettre le spirochète par l'ornithodore, mais pas par le pou. Et récemment une quatrième, puis une cinquième tentative ont été couronnées de succès.

EXPÉRIENCE N° 4. — Une souche de *Spirochæta duttoni* var. *Crociduræ*, isolée sur souris blanche le 16 décembre 1947 du cerveau d'une musaraigne capturée à Dakar, est entretenue sur souriceaux nouveau-nés (souris blanches de notre élevage). Le 8 mai 1948, le cerveau, le foie et la rate de 3 souriceaux (sixième passage) au sang fortement positif sont broyés et mis en suspension dans 7 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique ; 2 cobayes reçoivent chacun dans le péritoine 1 cm<sup>3</sup> de la suspension et un jeune singe (cynocéphale 130) également en injection intrapéritonéale, 1,5 cm<sup>3</sup> de la même suspension. Les cobayes ne font pas d'infection apparente, leur sang examiné chaque jour pendant trente jours demeure négatif. Le singe est positif le 11 mai ; le 12, son sang est assez riche en spirochètes (goutte épaisse colorée au Giemsa, examen à l'immersion, oculaire 4, objectif 1/15, 3 spirochètes par champ) ; on nourrit sur lui, pendant une heure, 155 poux recueillis la veille sur un aliéné à l'Hôpital Central Africain, tandis que

(1) Le Dr Baltazard nous a adressé une copie de ses communications avant leur publication. Nous l'en remercions vivement.

25 poux récoltés en même temps sur le même sujet serviront de contrôle de non-infection naturelle des poux. Un volontaire (homme sain), dont le sang inoculé à des souris blanches avant le début et à la fin de l'expérience montrera l'absence d'infection récurrentielle, est utilisé seul pendant toute la durée de l'expérience comme nourrisseur de poux infectés et de poux neufs. Chaque jour, pendant toute la durée de l'expérience, un certain nombre de poux infectés sont broyés, puis émulsionnés dans une petite quantité d'eau physiologique qui est utilisée pour inoculation et examen microscopique. Enfin, le dernier jour de l'expérience, les 15 survivants des 25 poux neufs sont broyés en eau physiologique ; l'examen microscopique et l'inoculation de l'émulsion à 5 souriceaux nouveau-nés demeurent négatifs. Le tableau ci-dessous donne le détail des opérations effectuées et des résultats obtenus.

DATE	JOUR	NOMBRE de poux vivants	NOMBRE de poux nourris	NOMBRE de repas	NOMBRE de poux broyés	EXAMEN DIRECT des poux broyés		ANIMAUX inoculés avec le broyat des poux	RÉSULTAT des inoculations
						Fond noir	Giemsa		
12 mai	1 <sup>er</sup>	155	155 sur cyno 130.	1	1	0	0		
13 mai	2 <sup>e</sup>	146	145 sur homme sain.	2	1	0	0	2 souris.	Négatif.
14 mai	3 <sup>e</sup>	138	—	2	1	0	0	2 souris.	Négatif.
15 mai	4 <sup>e</sup>	119	—	2	2	0	0	2 souris.	Négatif.
16 mai	5 <sup>e</sup>	112	—	1	2	0	0	2 souris.	Négatif.
17 mai	6 <sup>e</sup>	104	—	1	2	0	0	2 souris.	Négatif.
18 mai	7 <sup>e</sup>	95	—	2	2	0	0	2 souris.	Positif.
19 mai	8 <sup>e</sup>	91	—	2	2	0	0	2 souris.	Négatif.
20 mai	9 <sup>e</sup>	87	—	2	2	0	0	2 souris.	Positif.
21 mai	10 <sup>e</sup>	85	—	2	2	0	0	2 souris.	Négatif.
22 mai	11 <sup>e</sup>	74	—	2	2	0	0	2 souris.	Positif.
23 mai	12 <sup>e</sup>	67	—	1	5	+	0	2 souris.	Positif.
24 mai	13 <sup>e</sup>	62	—	2	3	0	0	3 souriceaux.	Positif.
25 mai	14 <sup>e</sup>	59	—	2	4	0	0	2 souris.	Positif.
26 mai	15 <sup>e</sup>	50			5	0	0	2 souris.	Négatif.
					40	0	0	Cyno. 131	Positif.

Par ailleurs, 6 nymphes d'*Ornithodoros erraticus* sont placées, le 13 mai, sur le cynocéphale 130 (il a servi à infecter les poux, le 13, son sang contient 1 spirochète pour 4 champs) ; les tiques se gorgent rapidement et bien ; portées le 15 juin sur un souriceau neuf, elles le contaminent (animal positif dans le sang le 21 juin).

EXPÉRIENCE N° 5. — Utilise la même souche de spirochètes et le même fournisseur de poux que l'expérience précédente. Le 15 mai 1948, 150 poux recueillis la veille sont placés par moitié pendant

une heure sur 2 souriceaux nouveau-nés (huitième passage), au sang fortement positif (20 spirochètes par champ). Un deuxième volontaire est utilisé comme nourrisseur des poux infectés et de 25 poux neufs témoins, il est surveillé dans les mêmes conditions que le nourrisseur de l'expérience précédente. Voici, condensé dans le tableau ci-dessous, le détail des examens :

DATE	JOUR	NOMBRE de poux vivants	NOMBRE de poux nourris	NOMBRE de repas	NOMBRE de poux broyés	EXAMEN DIRECT des poux broyés		ANIMAUX Inoculés avec le broyat des poux	RÉSULTAT des inoculations
						Fond noir	Giemsa		
15 mai	1 <sup>er</sup>	150	150	1 sur souriceau infecté	1	0	0		
16 mai	2 <sup>e</sup>	74	72	1	2	0	0	2 souris.	Négatif
17 mai	3 <sup>e</sup>	69	67	1	2	0	0	2 souris.	Négatif.
18 mai	4 <sup>e</sup>	66	64	2	2	0	0	2 souris.	Négatif.
19 mai	5 <sup>e</sup>	62	60	2	2	0	0	2 souris.	Négatif
20 mai	6 <sup>e</sup>	58	56	2	2	0	0	2 souris.	Négatif.
21 mai	7 <sup>e</sup>	52	50	2	2	0	0	2 souris.	Négatif.
22 mai	8 <sup>e</sup>	49	47	2	2	0	0	2 souris.	Positif.
23 mai	9 <sup>e</sup>	47	44	1	3	0	0	2 souris.	Négatif.
								5 souriceaux.	Négatif
24 mai	10 <sup>e</sup>	44	42	2	2	0	0	2 souris.	Négatif.
25 mai	11 <sup>e</sup>	42	37	2	5	+	0	2 souris.	Positif.
					3	0	0	2 souris.	Positif.
26 mai	12 <sup>e</sup>	37	34		34	0	0	5 souriceaux.	Positif.

Enfin, 5 nymphes d'*Ornithodoros erraticus*, gorgées le 4 juin sur le souriceau 123 (5 spirochètes par champ), qui est des souriceaux inoculés avec 34 poux du douzième jour, sont placées le 29 juin sur un souriceau neuf dont le sang est positif à compter du 5 juillet.

### III. — CONCLUSIONS.

Ainsi donc, au cours de deux expériences conduites à peu près simultanément, nous avons réussi à transmettre *Spirochara dutoni* var. *Crociduræ* par l'ornithodore, ce qui est classique, et également par le pou. Voici les conclusions de ces recherches :

1<sup>o</sup> Les nymphes d'*Ornithodoros erraticus* gorgées, vingt-cinq à trente-deux jours plus tôt, sur un animal porteur de spirochètes se sont infectées et ont transmis l'infection à la souris blanche par piqure ;

2<sup>o</sup> La souris blanche a pu être infectée par l'inoculation d'un broyat de poux infectieux ; les spirochètes sont apparus dans le sang après une incubation de trois à six jours, la maladie a toujours été importante puisque nous avons pu constater, à l'examen

du sang de chacune des souris, une densité de spirochètes au moins une fois égale à 5 spirochètes par champ, mais généralement beaucoup plus considérable ;

3° Le singe a été infecté, lui aussi, par l'inoculation de poux infectieux ; l'animal utilisé dans notre expérience (cynocéphale 131) n'a fait qu'une infection légère ; en effet, son sang prélevé huit jours après l'inoculation des poux a infecté la souris chez qui il avait été inoculé, mais l'examen microscopique n'a montré le spirochète que le vingt-neuvième jour de l'inoculation des poux ;

4° La piqûre de poux infectieux ne présente aucun danger pour l'homme ;

5° L'examen d'un pou broyé une heure après le repas infectant ne nous a pas permis de mettre le spirochète en évidence ; au cours de ces deux expériences, nous avons vu réapparaître le spirochète dans la cavité générale du pou (onzième et douzième jour du repas infectant), mais l'examen microscopique n'a été positif qu'une fois pour chaque expérience et le nombre des spirochètes visibles est très réduit puisque nous n'avons décelé le spirochète qu'au fond noir, un seul dans l'expérience n° 4 et 2 dans l'expérience n° 5 ; ces spirochètes étaient courts et mobiles ;

6° La virulence a pu être constatée à partir du septième jour dans l'expérience 4 et du huitième dans l'expérience 5. Bien entendu, les poux contenant des spirochètes visibles se sont montrés virulents mais, contrairement à ce que nous avons noté, lors de la transmission par le pou de *Spirochæta hispanica*, l'infection a pu être obtenue, après l'apparition du premier spirochète, par l'inoculation de poux dans lesquels nous n'avons pas vu le parasite ;

7° Tous les poux ne sont pas infectieux puisque dans chaque expérience, après la première inoculation positive, un certain nombre d'inoculations ultérieures ont été faites sans succès ;

8° Les spirochètes transmis par le pou (au moins ceux du premier passage) conservent leurs caractères de spirochètes à tiques ; en effet, ils déterminent une infection importante chez la souris, ils sont également susceptibles d'infecter l'ornithodore et d'être transmis par la piqûre de cet acarien.

★ ★

A première vue il peut paraître surprenant que pendant de longues années personne n'ait pu transmettre, ou du moins prouver sans discussion, la réalité de la transmission du spirochète de Dutton par l'intermédiaire du pou, puis que, presque simultanément, Ballazard avec des spirochètes d'ornithodores des terriers, Heisch et Garnham avec *Spirochæta duttoni* et nous-même avec *Spirochæta crociduræ*, ayons réussi plusieurs passages. Voici, à notre



avis, la raison de ces résultats en apparence contradictoires : le pou de l'homme ne peut, en dehors de l'homme, être entretenu que sur le singe : or, et cela à notre connaissance, n'a jamais été affirmé nettement, le singe, ou tout au moins le cynocéphale, nous paraît être un mauvais animal d'expérience pour l'étude du spirochète de Dutton ; il semble peu sensible à ce germe et il faut lui injecter une grande quantité de spirochètes virulents pour réaliser une infection importante et surtout trop souvent fugace. Dans une de nos premières expériences par exemple (cynocéphale 75, inoculé avec une suspension d'organes de souris très riche en spirochètes), le sang du singe contenait 3 spirochètes par champ une heure trente avant le début du repas des poux, mais à la fin du repas il n'y avait plus de spirochète visible. Le cynocéphale 130 (expérience n° 4) a reçu, le 8 mai, une dose massive de spirochètes ; il n'a pourtant fait qu'une infection légère (1 spirochète pour 5 champs le 11, 3 par champ le 12, 1 pour 4 champs le 13, 1 spirochète sur le frottis les 15 et 19 mai). Le cynocéphale 131 (expérience n° 4) a été inoculé le 26 mai avec le broyat de 40 poux infectieux ; des spirochètes ont été trouvés dans le sang les vingt-neuvième, trentième, trente et unième, trente-deuxième, trente-huitième et quarantième jours de l'infection ; mis à part le trente et unième jour (2 spirochètes par champ), ils ont toujours été rares. Le cynocéphale 135 inoculé le 26 juin avec 5 cm<sup>3</sup> de sang du cynocéphale 131 n'a fait également qu'une infection légère (spirochètes rares dans le sang de l'animal les 2, 3, 4, 5 et 14 juillet). Déjà Mathis signalait, en 1928, « que le sang des singes à spirochètes récurrents était peu virulent pour la souris » ; si le sang du singe infecté est peu virulent pour la souris, c'est qu'il constitue pour le spirochète de Dutton un mauvais milieu, si bien que seule une inoculation massive peut réaliser l'infection en bousculant les barrières de défense naturelles, et même à ce prix le singe se défend si vigoureusement contre le spirochète qu'il arrive à le détruire rapidement ; l'on comprend dès lors que l'inoculation de quelques spirochètes contenus dans la cavité générale du pou ne soit pas suffisante pour infecter régulièrement le singe. Les expérimentateurs qui, avant nous, ont utilisé le singe, n'ont pas eu, comme nous, la chance de déceler par l'examen direct des broyats de poux, le spirochète qui est, nous l'avons vu, difficilement mis en évidence ; le choix du singe pour recevoir les produits de broyage des poux infectés les a placés dans des conditions défavorables. Heisch et Garnham ont toutefois utilisé avec succès le cercopithèque comme animal réactif ; ils ont eu également de bons résultats avec la souris blanche ; enfin, dans plusieurs expériences, ils ont décelé par examen direct le spirochète dans le corps du pou. Notre choix, en se portant avant tout sur la souris blanche, animal réactif par excel-

lence du spirochète de Dutton, était logique. Notre expérience n° 4 confirme ces notions ; alors que 2 poux ont suffi à infecter la souris, alors que le broyat de 5 poux du quinzième jour a provoqué une infection très importante chez 2 souris blanches, le cynocéphale 131 inoculé avec 40 poux du quinzième jour n'a fait qu'une infection légère et le spirochète n'a été vu dans le sang que tardivement [vingt-neuvième jour] (2). Donc pour transmettre régulièrement par le pou le spirochète de Dutton, il ne suffit pas que le sang du singe soit suffisamment riche en spirochètes pendant toute la durée du repas infectant, il faut encore choisir un récepteur très sensible, en l'occurrence la souris blanche. Nous disons bien très sensible ; en effet, Nicolle, dans ses expériences réalisées en 1927, a bien, une fois, inoculé au rat blanc des broyats de poux ; or, le rat blanc est moins sensible que la souris blanche au spirochète de Dutton (Nicolle le signale d'ailleurs lui-même) ; peut-être faut-il chercher là la raison de son échec.

Baltazard et ses collaborateurs ont tourné la difficulté en se passant du singe ; ces savants avaient noté au cours de recherches antérieures la grande sensibilité des rongeurs nouveau-nés ; ils ont porté leur choix sur le lapin nouveau-né. Les poux neufs sont nourris sur un jeune lapin infecté, puis après entretien sur homme sain, ils sont inoculés à un deuxième lapin qui s'infecte régulièrement. Nous nous sommes inspiré de ces travaux, mais, pour des raisons purement matérielles, nous nous sommes adressé au souriceau blanc nouveau-né qui est d'autant plus indiqué pour l'étude du spirochète de Dutton que la souris blanche adulte est déjà elle-même très sensible. Mais ici surgit une nouvelle difficulté : le sang du singe convenait mal car son sang est, si l'on peut dire, toxique pour le spirochète ; ici le sang du rongeur est toxique pour le pou. Aussi les poux ne doivent-ils faire qu'un repas sur le rongeur infecté, puis être entretenus sur l'homme ; un nombre important de poux meurent rapidement, intoxiqués par le sang du souriceau, et ce sont vraisemblablement ceux qui ont absorbé le plus de sang ; il faut donc que le sang du rongeur soit riche en spirochètes pour que les poux qui résistent soient sûrement contaminés et puissent transmettre l'infection.

★★

Après Nicolle et Anderson, nous avons pu récemment transmettre *Spirochæta hispanica* par le pou ; nous apportons aujour-

(2) L'infection tardive du magot a été également constatée récemment par G. Blanc avec le spirochète de Goulimine. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1948, 41, 139.

d'hui la preuve de la transmission expérimentale par le pou de *Spirochæta duttoni* var. *Crocidura*. Cette transmission est-elle susceptible de se réaliser dans la nature? En d'autres termes, le pou est-il capable de s'infecter sur l'homme malade atteint, soit de spirochétose hispano-marocaine, soit de tick-typhus, et d'infecter à son tour un homme sain? Nous le pensons, mais cette éventualité est certainement rare. Il n'est pas inutile, en effet, de souligner que le pou ne peut s'infecter sûrement que s'il fait son repas de sang sur un sujet présentant, dans la circulation périphérique, une densité parasitaire suffisante en spirochètes et nous connaissons la rareté des spirochètes dans le sang des malades. Cette condition n'est d'ailleurs pas suffisante : après ingestion du spirochète, le pou passe par une phase négative d'une semaine environ, pendant laquelle il n'est pas infectieux ; pendant cette période silencieuse d'une semaine, le pou court de grands dangers pour son existence ; sa prolificité bien connue permet certes la perpétuation de l'espèce, mais elle ne permet pas la survie du spirochète qu'il porte puisque l'infection, chez lui, n'est sans doute pas héréditaire. Mais si le pou, une fois infecté, échappe à tous les périls qui le menacent, il peut logiquement réaliser un cas de transmission interhumaine. Ainsi serait franchie la première étape de l'évolution vers la récurrente à poux.

#### IV. — CONSIDÉRATIONS SUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA RÉCURRENTE À POUX.

Lorsque l'on fait l'historique de la fièvre récurrente à poux, l'on ne peut qu'être frappé de la durée vraiment considérable (vingt ans et plus) des silences interépidémiques, c'est-à-dire des périodes pendant lesquelles la maladie a disparu complètement de la surface du globe. Et une question vient naturellement à l'esprit : où et comment le virus se conserve-t-il ?

Dans la nature ? il n'en est pas question ; nous savons que le spirochète d'Obermeier est un germe exigeant qui n'est susceptible de subsister que chez le malade ou chez le pou.

Chez le pou ? il est maintenant admis que, de tous les invertébrés, seul le pou est susceptible de transmettre le spirochète d'Obermeier : or, le virus ne peut manifestement pas se conserver longtemps chez le pou. En effet, la longévité du pou est de l'ordre de six à huit semaines et l'infection du pou, si elle est héréditaire, ne dépasse pas une génération ; en outre, le spirochète ne survit pas à la mort du pou.

Existe-t-il un réservoir de virus animal ? Aucun cas d'infection spontanée par le spirochète d'Obermeier n'a jamais été observé chez l'animal. Au point de vue expérimental, le singe est le seul

animal vraiment sensible. mais l'infection, chez lui, est de courte durée et, une fois la maladie terminée, le spirochète ne peut être à nouveau mis en évidence.

Les rongeurs nouveau-nés, ainsi que l'a montré Baltazard, sont sensibles au spirochète récurrent mondial, mais l'infection est toujours de courte durée, soit qu'elle provoque un seul accès important, ainsi que nous l'avons constaté chez le souriceau, soit même qu'elle détermine une rechute, comme Baltazard l'a observé chez le lapin. L'homme serait-il donc le réservoir de virus ? Certains auteurs (Joyeux) pensent que la récurrente mondiale est entretenue dans les foyers par la persistance de formes latentes de l'infection et qu'à la faveur de causes favorisantes, l'épidémie se réveille. Ce n'est pas admissible ; la récurrente à poux est, au contraire, une maladie de courte durée ; elle est, comme le dit Nicolle, « la moins récurrente des spirochétozes ».

Il n'existe donc aucun réservoir de virus connu de la fièvre récurrente à poux. Comment expliquer alors ces épidémies de récurrente mondiale qui, au cours des âges, sont apparues en divers points du monde et à intervalles parfois fort éloignés ? Si l'on veut bien considérer que le berceau des épidémies de fièvre récurrente à poux est localisé dans les régions où l'on trouve des ornithodores et de la fièvre récurrente à tiques, il est logique de penser que le virus mondial résulte de la transformation, à certaines époques, dans certains cas et pour des causes encore inconnues, d'un virus récurrent à tiques. De cette opinion sont nées les tentatives faites pour démontrer le rôle des poux dans la transmission des spirochètes récurrents à tiques. Jusqu'ici les expériences faites dans ce sens étaient rares et peu démonstratives. Mais nous avons réussi depuis à transmettre *Spirochæta hispanica* par le pou ; Baltazard, Bahmanyar et Mofidi ont obtenu ensuite le même résultat avec *Spirochæta turicata*, *Spirochæta hermsi*, *Spirochæta microti* et *Spirochæta merionesi* ; Heisch et Garnham ont, de leur côté, réalisé la transmission par le pou de *Spirochæta duttoni* ; enfin, nous avons pu également transmettre par cet arthropode *Spirochæta duttoni* var. *crociduræ*. Puisque la transmission par le pou de ces sept spirochètes est possible, il est permis de penser qu'elle l'est avec toutes les autres espèces. Mais cette transmission n'est pas chose aisée ; nous venons de voir quelles conditions doivent être réunies pour permettre ce passage. C'est pour cette raison que les épidémies se succèdent de façon aussi irrégulière et sont entrecoupées de silences interépidémiques prolongés.

En conclusion, nous dirons que les recherches expérimentales récentes, venant confirmer celles réalisées par Nicolle et Anderson et par Mathis, permettent de penser, comme on l'a déjà supposé, que le virus épidémique trouve son origine dans le virus à tiques.



Ce n'est encore qu'une hypothèse, il faut maintenant apporter la preuve, c'est-à-dire faire d'un spirochète à tiques un authentique *Spirochaeta recurrentis*.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALTAZARD (M.), MOFIDI (C.) et BAHMANYAR (M.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1948, **41**, 399.
- [2] BALTAZARD (M.), MOFIDI (C.) et BAHMANYAR (M.). Solution aux difficultés de l'expérimentation avec le spirochète d'Obermeier. *A paraître*.
- [3] BALTAZARD (M.), BAHMANYAR (M.) et MOFIDI (C.). Fièvres récurrentes transmises à la fois par ornithodores et par poux. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1066.
- [4] BALTAZARD (M.), MOFIDI (C.), BAHMANYAR (M.) et SEYDIAN (B.). Modifications dans le comportement de souches de *Spirochaeta recurrentis* passées par les rongeurs. *A paraître*.
- [5] BOIRON (H.), KOERBER (R.) et CARRONNIER (M<sup>lle</sup> B.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1948, **41**, 81.
- [6] BOIRON (H.). *Bull. méd. de l'A. O. F.*, séance du 24 juin 1948.
- [7] BONÉ (G.). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1939, **19**, 477.
- [8] BRUMPT (E.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1908, **1**, 577.
- [9] BRUMPT (E.). *C. R. Acad. Sci.*, 1926, **183**, 1139.
- [10] BRUMPT (E.). *Précis de Parasitologie*, Masson et Cie, 5<sup>e</sup> édition, 1936.
- [11] COOK (Albert R.). *J. trop. méd.*, 1904, **7**, 24.
- [12] DURIEUX (C.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1932, **25**, 13.
- [13] EVERETT DUTTON (J.) et TODD (L. John). *Liverpool School of Med.*, mém. 17, novembre 1905.
- [14] HEISCH (R. B.) et GARNHAM (P. C.). *Parasitology*, n° 4, février 1948, **38**.
- [15] JOYEUX (Ch.). *Précis de Médecine coloniale*, Masson et Cie, 3<sup>e</sup> édition, 1944.
- [16] KLEINE (F. K.) et KRAUSE (M.). *Arch. Schiffs-u. Tropenhyg.*, 1934, **38**, 486.
- [17] MATHIS (C.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1928, **21**, 174.
- [18] MATHIS (C.), DURIEUX (C.) et ADVIER (M.). *Ces Annales*, 1934, **52**, 166.
- [19] NEVEU-LEMAIRE (M.). *Traité d'Entomol. méd. et vétér.*, Vigot frères, 1938.
- [20] NEVEU-LEMAIRE (M.). *Traité de Protozool. méd. et vétér.*, Vigot frères, 1943.
- [21] NICOLLE (Ch.), BLAIZOT (L.) et CONSEIL (E.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1913, **6**, 106.
- [22] NICOLLE (Ch.) et ANDERSON (Ch.). *C. R. Acad. Sci.*, 1926, **182**, 1450.
- [23] NICOLLE (Ch.) et ANDERSON (Ch.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1926, **15**, 197.
- [24] NICOLLE (Ch.) et ANDERSON (Ch.). *C. R. Acad. Sci.*, 1927, **185**, 373.
- [25] NICOLLE (Ch.) et ANDERSON (Ch.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1927, **16**, 123.

- [26] NICOLLE (Ch.), MATHIS (C.) et ANDERSON (Ch.). *C. R. Acad. Sci.*, 1928, **187**, 631.
- [27] NICOLLE (Ch.), ANDERSON (Ch.) et COLAS BELCOUR (J.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1930, **49**, 133.
- [28] ROSENHOLZ (H. P.). *Centralbl. Bakt.*, I, 1927, **102**, 179.
- [29] ROSENHOLZ (H. P.) et GILBERT (M. J.). *Centralbl. Bakt.*, I, 1927, **103**, 348.
- [30] ROSS (Philip H.) et MILNE (A. D.). *Brit. med. J.*, 26 novembre, 1904, 1453.
- [31] SCHUBERG (A.) et KUHN (Ph.). *Arb. Gesundheitsamt*, 1911, **31**, f. 2.
- [32] WOLLMAN (E.), ANDERSON (Ch.) et COLAS-BELCOUR (J.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1928, **47**, 229.

**SUR L'HÉMAGGLUTINATION  
PAR DES VIRUS POLIOMYÉLITIQUES MURINS  
ET LA DESTRUCTION ENZYMATIQUE  
DES RÉCEPTEURS DE VIRUS POLIOMYÉLITIQUE  
DE LA CELLULE RÉCEPTIVE**

par J.-D. VERLINDE et P. DE BAAN.

(*Section de Bactériologie et Pathologie expérimentale  
de l'Institut de Médecine Préventive, Leyden (Pays-Bas).*  
Directeur : Prof. Dr J. D. VERLINDE.)

Les recherches de Hirst [7] et de Burnet et de ses collaborateurs [3, 4] sur l'agglutination des hématies de poule par les virus du groupe grippal ont ouvert des perspectives extrêmement intéressantes sur les rapports entre virus et cellule réceptive (cellule capable d'absorber le virus). On sait l'importance de la réaction d'hémagglutination par le virus et de la réaction d'inhibition par l'antisérum homologue pour le diagnostic de la grippe, des oreillons, de la peste aviaire et de la maladie de Newcastle, ainsi que pour l'analyse antigénique de ces virus, mais c'est surtout la destruction enzymatique des récepteurs de virus à la superficie de la cellule qui a retenu notre attention, parce que ces récepteurs de virus pourraient être le point sensible permettant d'empêcher l'action pathogène du virus en bloquant la cellule.

Ces recherches nous ont conduits à chercher des phénomènes analogues dans la poliomyélite. Les résultats atteints jusqu'ici ne sont qu'incomplets et il faut considérer notre communication comme provisoire.

McCrea [5] a montré qu'un enzyme bactérien présent dans le filtrat d'une culture de *Vibrio cholerae* est capable de détruire les récepteurs du virus grippal se trouvant à la superficie des hématies de poule, en suite de quoi les hématies perdent leur pouvoir d'adsorber ce virus. Nous avons essayé de bloquer par voie enzymatique les cellules sensibles à l'infection poliomyélitique.

Pour des raisons pratiques, nous avons préféré au préalable faire des recherches sur la souris avec la souche murine SK de Jungeblut et Sanders [9]. Cependant un premier succès ne put pas

être obtenu une seconde fois. Le pouvoir destructif pour les récepteurs de virus fut déterminé régulièrement par la réaction d'hémagglutination à l'égard du virus grippal. Nous constatâmes que nos souches de *Vibrio cholerae* fournissaient, on ne sait pourquoi, un filtrat d'activité enzymatique faible. Au cours de nos tentatives de production de meilleurs filtrats, nous avons eu connaissance des communications de Hallauer [6], disant que les souches SK et MM (Jungeblut et Dalldorf [8]) peuvent agglutiner des hématies de mouton; et de Bremer et Mutsaers [2] publiant des résultats semblables avec la souche Lansing d'Armstrong [1]. Nous avons essayé de confirmer leurs observations et de les rendre utiles à nos recherches, qui ont été entreprises sur :

1° Le pouvoir hémagglutinant des souches Lansing, SK et MM et d'autres virus neurotropes ;

2° L'inhibition spécifique de l'hémagglutination par l'antisérum homologue ;

3° La destruction des récepteurs de virus poliomyélique *in vitro* et le blocage des cellules vivantes par l'enzyme du filtrat de *V. cholerae*.

#### LA RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION.

TECHNIQUE. — Un des virus suivants a été inoculé par voie cérébrale dans un des 10 groupes de 4-12 souris que comprenaient nos expériences.

1. La souche Lansing ;
2. La souche SK ;
3. La souche MM ;
4. Le virus de l'encéphalite japonaise ;
5. Le virus de l'encéphalite de Saint-Louis ;
6. Le virus de l'encéphalite épizootique du cheval, type oriental ;
7. Le virus de l'encéphalite épizootique du cheval, type occidental ;
8. Le virus de la chorioméningite lymphocytaire, souche Armstrong ;
9. Le virus de la chorioméningite lymphocytaire, souche de N, isolée dans notre laboratoire ;
10. La souche Pasteur du virus fixe de la rage.

Les animaux qui présentèrent des signes certains de la maladie (paralysie ou convulsions, d'après le virus injecté) furent tués sous narcose à l'éther. L'encéphale prélevé aseptiquement fut trituré dans un mortier avec de l'eau salée isotonique de façon à obtenir une suspension homogène à 5 p. 100. Cette suspension fut centrifugée dans une centrifuge simple de laboratoire pendant trente minutes à 3.500 tours/minute. Le liquide surnageant fut con-



sidéré comme suspension de virus à 1 : 20. Une série de dilutions aux titres 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, etc. fut préparée.

Les hématies provenaient de jeunes moutons de sexe masculin. Le sang fut prélevé aseptiquement à la veine jugulaire et défibriné immédiatement. Ce sang fut centrifugé et lavé trois fois avec de l'eau salée isotonique. Enfin une suspension d'hématies à 0,25 p. 100 fut préparée.

Pour effectuer la réaction d'hémagglutination, on utilise des tubes à agglutination, avec fond parfaitement arrondi, d'une lon-

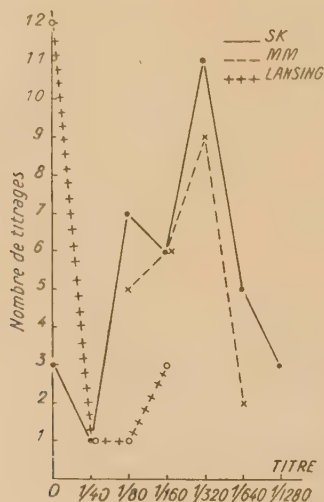


FIG. 1.

gueur de 10 centimètres et d'un diamètre intérieur de 9 millimètres.

On ajouta à la série de dilutions de suspension d'encéphale de souris une quantité égale (0,5 cm<sup>3</sup> par tube) de la suspension d'hématies 0,25 p. 100. Les tubes sont placés à température basse (4°C.) et la réaction est lue après deux-quatre heures, ainsi qu'après une nuit.

Lorsque l'hémagglutination n'a pas lieu, les hématies sont sédimentées en petit disque rond ; en secouant le tube, la suspension homogène se reforme. Dans le cas d'hémagglutination positive, il se constitue un dépôt de forme irrégulière, occupant toute la demi-sphère du fond du tube, qui, en secouant, se décolle difficilement pour former un conglomérat ou plusieurs flocons.

La figure 1 montre 73 titrages effectués avec les souches SK, MM et Lansing. On voit que le titre moyen des souches SK et MM

s'élève à 1/320. La souche Lansing ne provoque une réaction positive que dans quelques cas et encore à un titre peu élevé.

En général nous avons pu confirmer les observations de Hallauer [6] et de Bremer et Mutsaars [2], qui avaient constaté que des suspensions de cerveau de souris, sacrifiées au stade paralytique après l'infection cérébrale avec les souches SK, MM et Lansing, sont capables d'agglutiner des hématies de mouton. En outre, le virus de l'encéphalite japonaise se montra capable de donner la même réaction d'hémagglutination, tandis que nous n'avons obtenu que des résultats négatifs avec les virus de l'encéphalite de Saint-Louis, de l'encéphalite épizootique du cheval, de la chorioméningite lymphocytaire, le virus rabique fixe, une souche de *Toxoplasma* isolée dans notre laboratoire du liquide céphalo-rachidien d'un nourrisson [11], et avec des suspensions de cerveau de souris normales.

Avec des suspensions de cerveau non centrifugées, on n'obtient que des hémagglutinations non spécifiques ; de même avec des suspensions de cerveau et des matières fécales filtrées sur filtre Seitz EK.

Tandis que les souches SK et MM et le virus de l'encéphalite japonaise donnaient des résultats presque constamment positifs, l'hémagglutination par la souche Lansing n'était que très inconsistante. A cet égard, la concentration du virus dans le tissu cérébral paraît être un facteur important. D'après Hallauer [6] la virulence doit être  $10^{-4}$  au moins, et notre souche Lansing avait une virulence faible. Le fait que Bremer et Mutsaars avec leur souche Lansing ont apparemment obtenu des résultats meilleurs, tient vraisemblablement à ce qu'ils ont travaillé avec une souche de haute virulence. Car leurs souris présentèrent déjà des symptômes de paralysie deux jours après l'inoculation, tandis que la durée d'incubation de notre souche varia sensiblement et comporta en moyenne douze jours.

La virulence des autres virus neurotropes dans nos épreuves était assez élevée et probablement ces réactions d'hémagglutination sont réellement négatives.

#### L'INHIBITION DE LA RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION PAR L'ANTISÉRUM.

Les antisérums furent préparés chez des lapins. Une fois par semaine on injecta à ces animaux, par voie sous-cutanée, des quantités croissantes de suspension d'encéphale virulent de souris. Un lapin témoin fut immunisé de la même façon avec une suspension d'encéphale d'une souris normale. Les lapins furent saignés une semaine après la dernière injection et le taux d'anticorps neutralisants fut déterminé de la manière habituelle par l'épreuve de

neutralisation chez la souris. Le titre des anticorps était suffisant, sauf chez l'animal immunisé avec la souche Lansing.

La réaction d'inhibition fut effectuée en ajoutant 0,25 cm<sup>3</sup> d'une série de dilutions du sérum à 0,5 cm<sup>3</sup> d'une suspension centrifugée d'encéphale virulent de souris. Les tubes furent placés à 37° C. au bain-marie pendant vingt minutes, puis on ajouta 0,25 cm<sup>3</sup> d'une suspension d'hématies de mouton à 0,5 p. 100, et les tubes furent maintenus à 4° C.

La concentration de la suspension de cerveau fut choisie de manière que chaque tube contint 4 unités hémagglutinantes. Pour cela, chaque réaction d'inhibition fut précédée d'une détermination du titre d'hémagglutination de la suspension de cerveau. Cette réaction préalable fut notée après quatre heures. Immédiatement après, la réaction d'inhibition fut effectuée ; de cette façon, les deux réactions pouvaient être faites avec une suspension de cerveau fraîche.

Nous entendons par unité hémagglutinante 0,5 cm<sup>3</sup> de la dilution limite de virus provoquant encore l'hémagglutination. Ce titre étant 1 : 320, 0,5 cm<sup>3</sup> d'une dilution à 1 : 80 ou 0,25 cm<sup>3</sup> d'une dilution à 1 : 40 équivaldra à 4 unités hémagglutinantes. Ces dilutions sont les dilutions finales.

En déterminant l'action inhibitrice d'un sérum sur l'hémagglutination par des virus, on doit tenir compte du fait que les sérums normaux de lapin, de même que les sérums humains, produisent une certaine agglutination des hématies de mouton, par suite de la présence d'anticorps hétérophiles. Sauf dans la mononucléose infectieuse, dans laquelle le taux des anticorps hétérophiles peut être très élevé (réaction de Paul et Bunnell), leur titre dans les sérums de lapin ne dépassa pas dans nos expériences 1 : 16 et, par conséquent, cette dilution finale du sérum fut choisie comme la première de la série.

Les résultats des réactions d'inhibition, répétées et croisées, avec les souches SK, MM et le virus de l'encéphalite japonaise et leurs antisérums sont reproduits dans le tableau 1.

Ce tableau montre que le sérum du lapin témoin, immunisé avec l'encéphale de souris normales, ne présente pas de propriétés inhibitrices. Quoiqu'ils ne figurent pas dans le tableau, les sérums préparés contre les virus de l'encéphalite épizootique du cheval, de l'encéphalite de Saint-Louis, de la chorioméningite lymphocytaire et le virus de la rage, n'ont montré aucun pouvoir inhibiteur pour l'hémagglutination des virus SK, MM et de l'encéphalite japonaise. Les antisérums contre les virus SK, MM et de l'encéphalite japonaise, au contraire, ont manifesté une activité inhibitrice.

Le nombre de titrages est encore trop restreint et la technique est encore trop insuffisamment standardisée pour pouvoir tirer

TABLEAU I.

ANTISÉRUM	VIRUS	DILUTIONS FINALES DES SÉRUMS								
		1/6	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1.024	1/2.048	1/4.096
SK	SK	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	SK	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	MM	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	MM	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Jap.	—	—	—	—	—	—	—	+	+
MM	SK	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	SK	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	MM	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	MM	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Jap.	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Jap.	SK	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	SK	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	MM	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	MM	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Jap.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cerveau de souris normales.	Jap.	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	SK	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SK	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Jap.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Jap.	+	+	+	+	+	+	+	+	+

des conclusions définitives. Provisoirement il semble que ces trois virus présentent entre eux une certaine parenté.

L'antisérum SK exerce une action inhibitrice certainement plus efficace sur l'hémagglutination par la souche SK que sur celle par la souche MM, mais la différence entre la souche SK et le virus de l'encéphalite japonaise ne ressort pas clairement dans la réaction d'inhibition par l'antisérum SK. La différence entre la souche SK et le virus de l'encéphalite japonaise se révéla plus nette dans la réaction d'inhibition avec le sérum contre le virus de l'encéphalite japonaise, tandis que la différence entre les souches SK et MM y était moins marquée. L'antisérum MM ne présentait pas de propriétés inhibitrices spécifiques.

#### L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DU FILTRAT DE « V. CHOLERÆ ».

Par exception les suspensions de tous les virus neurotropes et celles de cerveau normal provoquaient l'hémagglutination par suite d'une contamination microbienne de la suspension d'héma-



ties. Ce phénomène bien connu (phénomène de Thomsen-Friedenrich) serait provoqué par une mucinase bactérienne. Un tel enzyme, présent entre autres dans le filtrat de culture de *Vibrio cholerae*, est capable de détruire les récepteurs de virus grippal à la surface des hématies de poule : des hématies traitées avec du filtrat de *V. cholerae* ne sont pas capables d'adsorber le virus grippal et, par conséquent, ne sont plus agglutinables par ce virus.

Nous avons établi que les hématies de mouton également deviennent inagglutinables par les souches Lansing, SK et MM et par le virus de l'encéphalite japonaise après qu'elles ont été traitées avec du filtrat de *V. cholerae*.

L'activité enzymatique du filtrat de *V. cholerae* préparé selon la méthode décrite par Burnet [3] fut déterminée en mélangeant 0,25 cm<sup>3</sup> d'une série de dilutions du filtrat et 0,25 cm<sup>3</sup> de suspension d'hématies de mouton à 0,5 p. 100, dans des tubes à agglutination. Les tubes furent placés à 37° C. au bain-marie pendant une demi-heure. Ensuite, 0,5 cm<sup>3</sup> de suspension de cerveau virulent fut ajouté et les tubes furent maintenus à 4° C. La réaction fut notée après deux et quatre heures et après une nuit. Dans les tubes contenant des dilutions du filtrat jusqu'à 1 : 640 à 1 : 2560, on ne vit pas d'hémagglutination des virus SK, MM et de l'encéphalite japonaise par 16 ou 32 unités hémagglutinantes (tableau II).

TABLEAU II.

VIRUS	TITRE d'hémagglutination	UNITÉS hémagglutinantes	DILUTIONS FINALES DU FILTRAT DE <i>V. cholerae</i>								
			1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280	1/2.560	1/5.120
SK	1 : 320	16	—	—	—	—	—	—	—	+	
SK	1 : 640	32	—	—	—	—	—	—	—	+	
MM	1 : 320	16	—	—	—	—	—	—	+	+	
MM	1 : 640	32	—	—	—	—	—	—	+	+	
Jap.	1 : 320	16	—	—	—	—	—	—	—	+	

Ces recherches montrent que la cellule peut être bloquée *in vitro* dans son pouvoir d'adsorption des virus poliomyélitiques. Nous avons fait des recherches semblables sur l'animal vivant avec la souche SK ainsi qu'avec le virus grippal.

Les résultats pour la grippe furent un peu décevants. Si l'on suppose que chez la souris les cellules épithéliales des voies respiratoires entières sont capables d'adsorber le virus grippal, la

difficulté d'un blocus complet par inhalation du filtrat de choléra est évidente, car la dose maximum inhalée par l'animal sous narcose est de 3 gouttes. Cependant, Stone [10] a réussi à protéger des souris contre l'infection par le virus grippal.

Dans la poliomyélite expérimentale de la souris avec la souche SK, nous avons fait usage de l'infection et de l'administration du filtrat de choléra par voie intrapéritonéale. On peut ainsi administrer le filtrat à plusieurs reprises et en quantités relativement grandes. Supposons que les cellules du péritoine, et éventuellement les plaques terminales, possèdent des récepteurs pour le virus poliomyélitique murin, qu'elles soient capables d'absorber ce virus et que l'administration du filtrat de choléra conduise à la destruction enzymatique des récepteurs, un blocus complet devrait être possible.

Une série de 110 souris fut inoculée par voie intrapéritonéale avec 0,1 cm<sup>3</sup> d'une suspension de cerveau diluée à 10<sup>-6</sup> et contenant 10.000 doses léthales. 80 souris furent traitées avec 0,5 cm<sup>3</sup> de filtrat de choléra dilué au 1/100, également par voie intrapéritonéale. Les 30 autres souris servirent de témoins.

Le tableau III montre que le pourcentage des souris survivantes est considérablement plus élevé dans les groupes traités que dans le groupe témoin.

TABLEAU III.

GROUPE TRAITEMENT	NOMBRE DE SOURIS		TEMPS de survie
	traitées	survivantes	
1. Nul (groupe témoin) . . .	30	2 (7 p. 100)	5 (4-10 jours).
2. Filtrat de choléra une fois, simultanément avec l'in- fection. . . . .	56	22 (40 p. 100)	8 (3-17 jours).
3. Filtrat de choléra une fois par jour pendant 2 à 7 jours . . . . .	24	18 (75 p. 100)	12 (7-17 jours).

La figure II montre la différence du temps de survie des animaux morts. Le filtrat de choléra exerce donc une certaine activité protectrice, dont le mécanisme ne doit pas être cherché dans une destruction du virus, mais dans une destruction enzymatique des récepteurs de virus, qui empêche l'adsorption du virus par les cellules réceptives. Néanmoins, la plupart des animaux traités une fois succombèrent à l'infection, après une période d'incubation prolongée de trois jours en moyenne. Il est évident que la cellule vivante peut développer en trois jours de nouveaux récep-

teurs, qui adsorbent le virus dans le cas où il est encore présent dans la cavité abdominale.

Chez les animaux survivants, le virus ne trouvant que des cellules bloquées et étant incapable de se propager dans ces cellules sera inactivé et probablement détruit par les moyens de défense naturels, sans immuniser l'organisme, car la grande majorité des souris ne montrèrent pas d'immunité à une nouvelle infection intrapéritonéale. Cette observation pourrait indiquer, en effet, que le virus n'a pas franchi la barrière enzymatique.

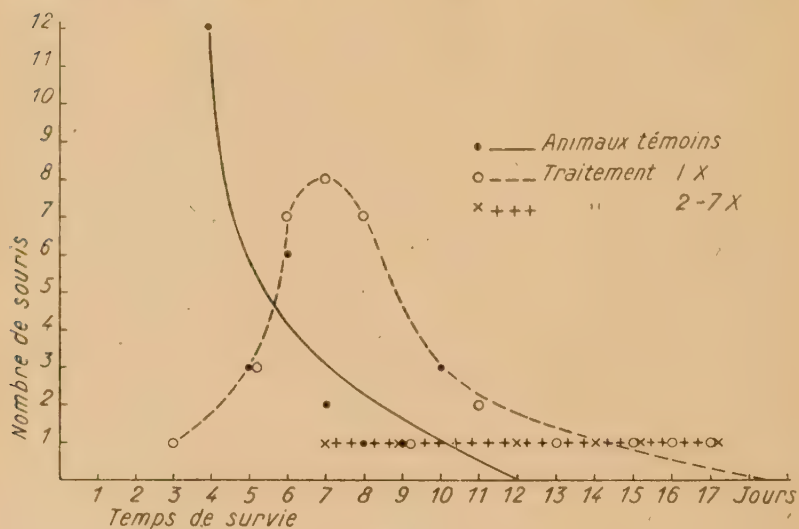


FIG. 2.

## RÉSUMÉ.

Les souches SK, MM et Lansing du virus poliomyélique et le virus de l'encéphalite japonaise se montrent capables d'agglutiner des hématies de mouton. Les antisérums homologues de lapin, provoquent une inhibition plus ou moins spécifique de l'hémagglutination. Les virus de l'encéphalite de Saint-Louis, de l'encéphalite épizootique du cheval, de la chorioméningite lymphocytaire et le virus fixe de la rage ne donnent que des réactions d'hémagglutination négatives. Des hématies de mouton traitées avec du filtrat de culture de *Vibrio cholerae* sont inagglutinables par les virus étudiés. Chez des souris infectées par voie intrapéritonéale avec la souche SK, le filtrat de choléra exerce, après l'injection intrapéritonéale, une certaine activité protectrice, dont le mécanisme doit être cherché dans une destruction

enzymatique des récepteurs de virus, qui empêche l'adsorption du virus par les cellules réceptives.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARMSTRONG (Ch). *Publ. Health Rep.*, 1939, **54**, 1719, 2302.
- [2] BREMER (A.) et MUTSAARS (W.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1194.
- [3] BURNET (F. M.). *Lancet*, 1948, **1**, 7.
- [4] BURNET (F. M.), MCCREA (J. F.) et STONE (J. D.). *Brit. J. exp. Path.*, 1946, **27**, 228.
- [5] MCCREA (J. F.). *Austr. J. exp. Biol.*, 1947, **25**, 127.
- [6] HALLAUER (C.). *Proceed. Fourth Internat. Congr. Microbiol.*, 1947, 257.
- [7] HIRST (G. K.). *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 49 ; **76**, 195 ; 1943, **87**, 99.
- [8] JUNGBLUT (C. W.) et DALLDORF (G.). *Am. J. publ. Health*, 1943, **33**, 169.
- [9] JUNGBLUT (C. W.) et SANDERS (W.). *J. exp. Med.*, 1940, **72**, 407.
- [10] STONE (J. D.). *Austr. J. exp. Biol.*, 1948, **26**, 287.
- [11] WINSSER (J.), VERLINDE (J. D.), VAN THIEL (P. H.), DAVEL (J.) et VAN DER ELST (P.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1948, **67**, 292.

## ERRATUM

Communication F. Tison : « Perfectionnements aux procédés usuels de culture du bacille de Koch à partir des produits surinfectés » :

Ces *Annales*, septembre 1949, **77**, 313, dixième ligne :

Au lieu de : 3  $cm^3$  à 4 p. 100 mesurés à la pipette...

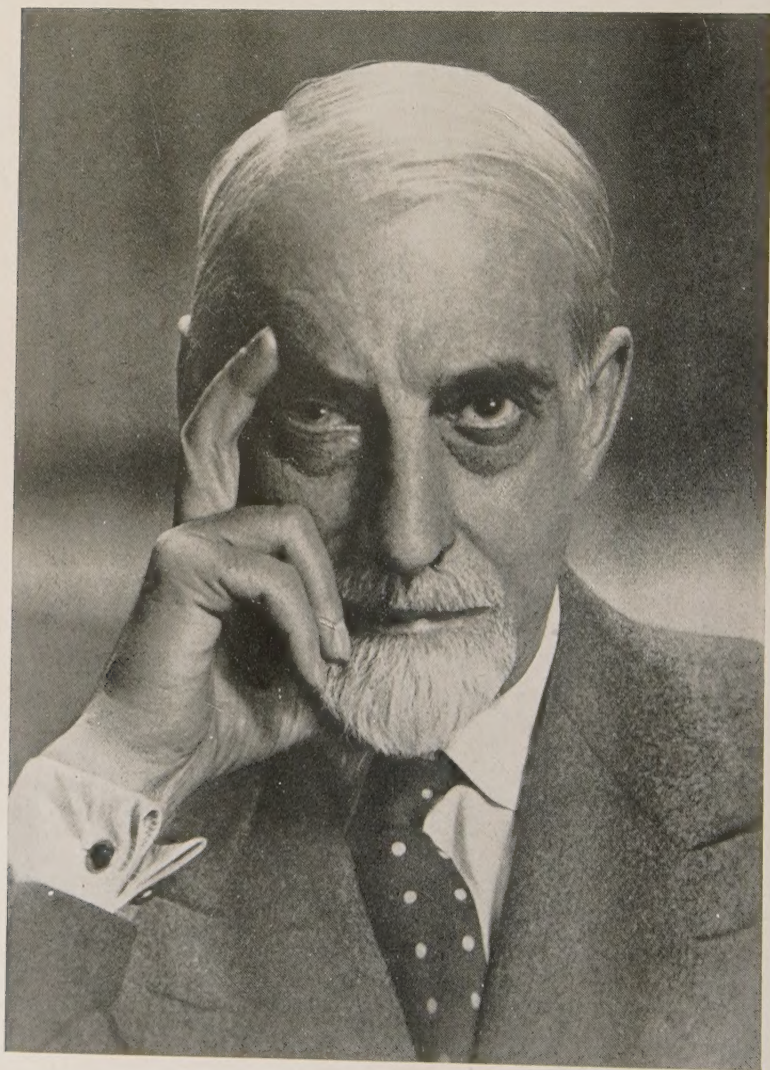
Lire : 8  $cm^3$  à 4 p. 100 mesurés à la pipette...

Le Gérant : G. MASSON.









ERNEST FOURNEAU  
(1872-1949)